



Facultad de Ciencias

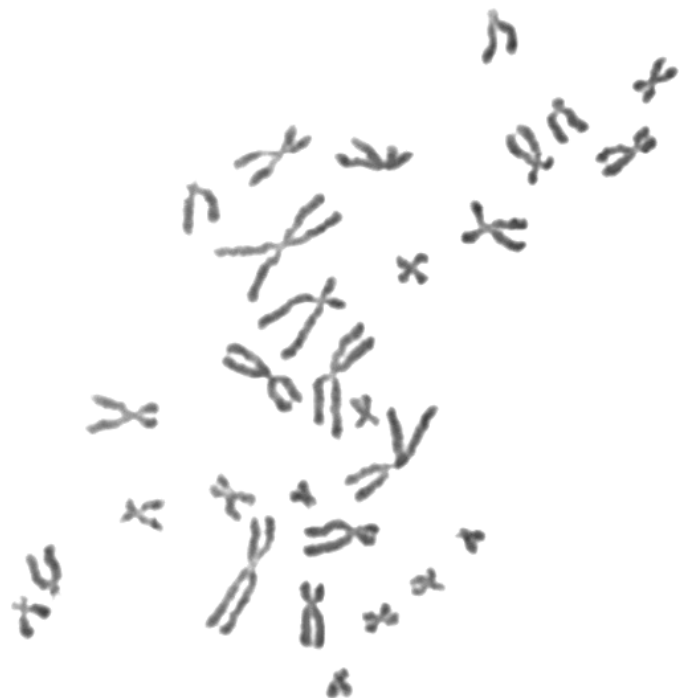
Dpto. de Biología

# Aplicación de nuevas técnicas moleculares al estudio de alteraciones cromosómicas en abortos espontáneos

Dan Diego Álvarez

Tesis Doctoral

Madrid, 2007





Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Dpto. de Biología

Aplicación de nuevas técnicas moleculares  
al estudio de alteraciones cromosómicas  
en abortos espontáneos

Dan Diego Álvarez

Tesis Doctoral  
Madrid, 2007



CIBERER U704

**ciberer**

Centro de Investigación Biomédica En Red  
de **Enfermedades Raras**



**Capio Fundación Jiménez Díaz**

La Doctora Isabel Lorda Sánchez, médico adjunto del Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz,

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada "*Aplicación de nuevas técnicas moleculares al estudio de alteraciones cromosómicas en abortos espontáneos*", que presenta Don Dan Diego Álvarez para obtener el Grado de Doctor, ha sido realizada bajo mi dirección, autorizándola para su presentación al Tribunal Calificador.

En Madrid, a 14 de noviembre de 2007

VºBº

Fdo. Dra. Isabel Lorda Sánchez  
Directora de la Tesis Doctoral

Fdo. Prof. Antonia Fernández Peralta  
Tutora de la Tesis Doctoral

# AGRADECIMIENTOS

Llegado el momento de escribir estas líneas, son muchos los recuerdos de aquellas personas, situaciones y vivencias que, echando la vista casi cinco años atrás, me vienen a la cabeza. En cierto modo, todas ellas han condicionado lo que hoy soy y de alguna forma son, más que partícipes, “responsables” de este trabajo.

Por ello, en primer lugar, me gustaría agradecer a las Dras. Carmen Ayuso y Carmen Ramos la posibilidad que me dieron en su día de poder formarme como asistente voluntario en el Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz y posteriormente, haberme brindado hasta el día de hoy innumerables oportunidades para poder continuar desarrollando mi trabajo. *Os admiro y respeto.*

En segundo lugar, mi eterno agradecimiento a la Dra. Isabel Lorda por haber confiado en mí desde un principio y siempre. Por haberme dado libertad para desarrollar mi trabajo, haberme escuchado y ofrecido sabio consejo, y sobre todo, por haberme comprendido y apoyado ante cualquier situación y en todo momento, mirando por mi bien, y dándome la oportunidad de viajar y conocer mundo asistiendo a un sin fin de reuniones y congresos. *Una persona especial y excelente; una auténtica suerte de jefa.*

A todos mis compañeros, agradecerles que me hayan sabido soportar (algunos mejor que otros), pero sobre todo por haber compartido conmigo desinteresadamente y con ilusión su experiencia, su tiempo y sus conocimientos, además de haberme hecho partícipe de sus inquietudes pidiéndome consejo, opinión o ayuda en determinados momentos: Jesús Gallego, María José Trujillo, María García, Ascensión Giménez -Chony-, Rosa Riveiro, Amelia Queipo, Cristina Villaverde, Jana Aguirre, Miguel Ángel López, Almudena Ávila, Diego Cantalapiedra, Teresa Barrero, Aurora Marín, Marta Rodríguez de Alba, Rocío Cardero, Fernando Infantes, Nuria Pérez, Carolina Arroyo, Belén Gómez, Mónica Martínez, Toñi Lucas, Ana Bustamante y Elena Vallespín. *Y aunque el roce no deja de ser fricción y por lo tanto, en ocasiones desgasta y quema...también hace el cariño. Os aprecio.*

Elena y Ana... *¿qué deciros? En vosotras he encontrado apoyo en todo momento; hemos compartido muchos buenos momentos y en aquellos malos, nunca me habéis fallado. Gracias por vuestro cariño, amistad y compañerismo. Sabéis lo importantes que sois para mí.*

A Cristina González, por a pesar de haber coincidido durante tan poco tiempo en el laboratorio, haberme seguido ayudando y apoyando de manera desinteresada hasta el día de hoy. *Gracias, de verdad.*

A aquellas personas de otros servicios del hospital que, siempre con muchísimo cariño y dedicación, han respondido siempre a mis peticiones de favores, ya fueran personales o profesionales, con una sonrisa y regalándome parte de su tiempo: Piluca, Valentín Calvo, Rosa García, José Aneiros, José Díaz, Rubén San Pablo, Félix Manzarbeitia, Joaquín Díaz Recasens, Chus y Esther. *Mi más sincero agradecimiento.*

A mi gente; esa que me conoce, comprende y perdona, esas -en ocasiones demasiado largas y frecuentes- esperas y encierros en uno mismo: Esther, Marcela, María, Silvia, Gon, Elena, Isa, Ainhoa, Carmen Laura... *Mil gracias. Os quiero.*

A mis “otros jefes”, Erica e Isra; por haberme hecho sentir útil y muy cómodo trabajando a vuestro lado, haberme comprendido en todo momento haciendo todo aquello que estuviera en vuestra mano. *Aquí tenéis un amigo.*

A mis compañeros de la Universidad SEK de Segovia y en especial, a Jesús Gómez Ochoa de Alda por haber confiado en mí, dándome la oportunidad de enseñar parte de lo aprendido volviendo a la universidad en la que recibí, y aún sigo recibiendo, tanto cariño. *GRACIAS.*

A Maria Antonia Fernández Peralta; *gracias por tu amabilidad y disposición siempre que lo he necesitado.*

A todo aquel que sin tan siquiera conocerme, ha hecho posible la realización de este trabajo; profesionales sanitarios y pacientes voluntarios.

A la Fundación “Conchita Rábago de Jiménez Díaz” por becarme durante estos cuatro años.

Al CIBERER por financiar parte del presente trabajo.

Y por último, a mi FAMILIA: padres, hermanos (Estíbaliz, Maite y Gonzalo), tía Lolina y abuelos; diferentes cromosomas pero sin duda, bastantes regiones compartidas en todos ellos. A Vicky y Jose Luis, por aguantar la “expresión” de nuestros genes. *A todos vosotros va dedicada esta tesis. Porque a pesar de las distancias, sin vuestro apoyo, aceptación, orgullo, cariño, guisos, mensajes, llamadas, favores, préstamos, y respeto...este trabajo nunca se habría escrito. Os quiero.*

Learning what I am  
Feeling like a bluebird  
Flying away

So I flew unto a tree  
To gather inspiration  
Happy to meet  
All the other birds

We talk about our flight  
In this queer dimension  
And how we're afraid  
To carry on our own  
And finish our direction  
Flying home

*(In Flight, Linda Perry, 1996)*

# ÍNDICE



ÍNDICE .....	1
1 – INTRODUCCIÓN .....	5
1.1 – El aborto espontáneo y sus causas .....	6
1.2 – Antecedentes y situación actual del estudio cromosómico de abortos espontáneos .....	15
1.3 – Técnicas moleculares para la detección de anomalías cromosómicas .....	16
1.3.1 – QF-PCR ( <i>Quantitative Fluorescent - Polymerase Chain Reaction</i> ) .....	16
1.3.2 – CGH ( <i>Comparative Genomic Hybridization</i> ) .....	18
1.3.3 – MLPA ( <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> ) .....	20
1.3.4 – Array based CGH .....	23
2 – OBJETIVOS .....	24
3 – MATERIAL Y MÉTODOS .....	26
3.1 – Naturaleza y origen de las muestras empleadas en el presente estudio .....	27
3.2 – Estudio citogenético .....	29
3.2.1 – Procesamiento de los restos abortivos para la realización del cariotipo .....	29
3.2.1.1 – Cultivo .....	29
3.2.1.2 – Sacrificio .....	30
3.2.1.3 – Extensión .....	30
3.2.1.4 – Obtención de patrón de bandas G para realización del cariotipo .....	30
3.2.1.5 – Visualización al microscopio y cariotipado .....	31
3.3 – Estudio molecular de alteraciones cromosómicas .....	31
3.3.1 – Extracción de ADN .....	31
3.3.1.1 – Extracción de ADN a partir de restos abortivos (QIAamp DNA Blood Mini Kit) ....	31
3.3.1.2 – Extracción de ADN con el BioRobot EZ1 .....	32
3.3.2 – Técnicas moleculares .....	33
3.3.2.1 – QF-PCR .....	33
3.3.2.1.1 – Detección de alteraciones cromosómicas numéricas: ensayo de validación	33
3.3.2.1.2 – Detección de mosaicismos cromosómicos .....	39
3.3.2.1.2.1 – Mosaicismos numéricos en un mismo tejido .....	39
3.3.2.1.2.2 – Mosaicismos numéricos confinados a un tejido .....	39
3.3.2.1.3 – Diagnóstico de molas hidatidiformes .....	40
3.3.2.1.4 – Determinación del origen parental y meiótico / mitótico de la aneuploidía ...	40
3.3.2.2 – CGH .....	40

3.3.2.3 – MLPA .....	44
3.3.2.3.1 – Detección de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales desequilibradas: ensayo de validación .....	44
3.3.2.3.2 – Detección de mosaicismos cromosómicos .....	46
3.3.2.4 – 1 Mb array CGH .....	47
3.4 – Distribución temporal del trabajo .....	52
4 – RESULTADOS .....	53
4.1 – QF-PCR .....	54
4.1.1 – Detección de alteraciones cromosómicas numéricas: ensayo de validación .....	54
4.1.2 – Detección de mosaicismos cromosómicos .....	62
4.1.2.1 – Ensayo de sensibilidad en la detección de mosaicismos .....	62
4.1.2.2 – Resolución de un caso clínico .....	63
4.1.2.3 – Evidencia de mosaicismo cromosómico confinado a la placenta .....	64
4.1.3 – Diagnóstico de molas hidatidiformes .....	67
4.1.4 – Determinación del origen parental y meiótico / mitótico de la aneuploidía .....	69
4.2 – CGH .....	70
4.3 – MLPA .....	72
4.3.1 – Detección de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales desequilibradas: ensayo de validación .....	72
4.3.2 – Detección de mosaicismos cromosómicos .....	78
4.4 – 1 Mb array CGH .....	79
5 – DISCUSIÓN .....	82
5.1 – Consideraciones acerca del procesado y selección de la muestra .....	83
5.2 – Valoración de las técnicas moleculares .....	85
5.2.1 – QF-PCR .....	85
5.2.2 – CGH .....	88
5.2.3 – MLPA .....	89
5.2.4 – 1 Mb array CGH .....	91
5.3 – Protocolo óptimo recomendado para el estudio de alteraciones cromosómicas en abortos espontáneos .....	93
5.4 – Acerca de la conveniencia de reevaluar la incidencia de alteraciones cromosómicas en abortos espontáneos y parejas con abortos de repetición .....	94
6 – CONCLUSIONES .....	100

7 – BIBLIOGRAFÍA .....	103
------------------------	-----

## ANEXOS

Anexo I – Comunicaciones a congresos tipo póster

Anexo II – Publicaciones derivadas del presente trabajo

Anexo III – Recursos en la web

Anexo IV – Ideogramas del cariotipo humano

Anexo V – Modelos de consentimiento informado

## NOTA DEL AUTOR

# 1 – INTRODUCCIÓN

## 1.1 – El aborto espontáneo y sus causas

El aborto espontáneo, definido como la interrupción involuntaria del embarazo hasta la vigésima cuarta semana de gestación (o “expulsión de un feto o embrión de 500 g de peso o menos” según definición propuesta por la Organización Mundial de la Salud, siendo estos valores los correspondientes a edades gestacionales de entre la vigésima y vigésimo segunda semana de embarazo), acontece en aproximadamente un 15% de las gestaciones clínicamente reconocidas en la especie humana (Warburton y Fraser, 1964; Miller *et al.*, 1980; Warburton *et al.*, 1980) y se estima que se produzca en torno al 65% del total de éstas (Santalo *et al.*, 1987; Benkhalifa *et al.*, 1992), constituyendo una de las causas más frecuentes de infertilidad en los países desarrollados. Estudios epidemiológicos sostienen que al menos un 25% de todas las mujeres tendrá algún aborto durante su vida (Wilcox *et al.*, 1988) y que alrededor del 1 al 5% de las parejas que intentan tener descendencia sufre abortos de repetición (Stirrat, 1990a; Forti y Krausz, 1998; Rai y Regan, 2006; Cousineau y Domar, 2007), considerada esta situación como la pérdida consecutiva de dos o más gestaciones. Sin embargo, en la mayoría de los casos (37-79%) las parejas no reciben explicación alguna acerca de la pérdida de su embarazo (Hatasaka, 1994; Stephenson, 1996).

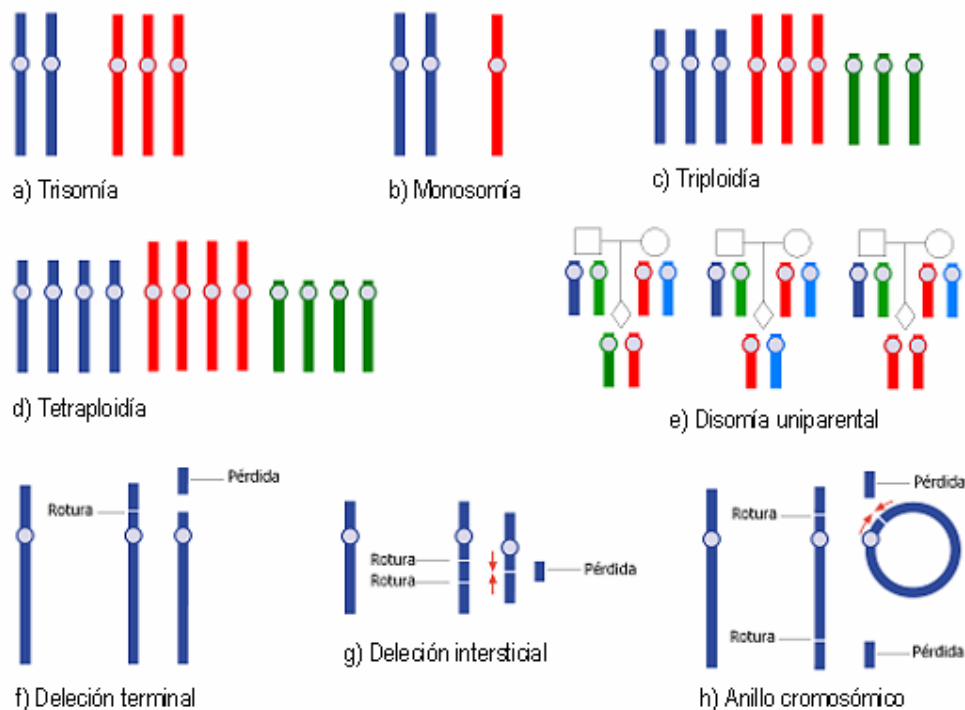
Según datos del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI), unas 800.000 parejas sufren problemas de fertilidad en nuestro país. Numerosos estudios se han centrado en las repercusiones psicológicas que dicho problema reproductivo supone para ambos miembros de la pareja, habiéndose descrito a menudo en estos pacientes sentimiento de confusión, ansiedad, sufrimiento, baja autoestima, culpabilidad o depresión entre otras manifestaciones ante la dificultad y/o incapacidad reproductiva (Nikcevic *et al.*, 1998; Griebel *et al.*, 2005; Cousineau y Domar, 2007). Asimismo, se ha demostrado que el conocimiento de la causa de la interrupción del embarazo reduce significativamente tanto el estrés psicológico a largo plazo como el sentimiento de culpabilidad generado en la mujer tras sufrir un aborto (Nikcevic *et al.*, 1999).

Aunque algunos factores de riesgo de aborto como el consumo durante el embarazo de determinadas sustancias como café (Linn *et al.*, 1982; Watkinson y Fried, 1985; Mills *et al.*, 1993; Dominguez-Rojas *et al.*, 1994; Parazzini *et al.*, 1998; Rasch, 2003), tabaco (Kline *et al.*, 1977; Harlap y Shiono, 1980; Risch *et al.*, 1988; Sandhal, 1989; Dominguez-Rojas *et al.*, 1994), alcohol (Abel, 1997; Windham *et al.*, 1997) o ciertas drogas (Greenland *et al.*, 1983; Linn *et al.*, 1983) han sido extensamente debatidos (ver García Enguádanos A. 1999, tesis doctoral), a la par que aquellos que tratan de establecer una posible relación entre la edad paterna avanzada y el riesgo de aborto (de La Rochebrochard y Thonneau, 2002; Slama *et al.*, 2005; Kleinhaus *et al.*, 2006), la edad materna en el momento del embarazo constituye el único factor de riesgo ampliamente demostrado (Hassold *et al.*, 1980; Hassold y Jacobs, 1984; Hassold y Chiu, 1985), aumentando éste a medida que aumenta la edad materna de

manera (casi) exponencial a partir de los 35 años de edad debido al riesgo de aneuploidías en el feto. Es evidente que el comportamiento reproductivo de nuestra sociedad ha cambiado, encaminada hacia una más tardía maternidad, justificándose por tanto el desarrollo de las cada vez más demandadas técnicas de reproducción asistida que permitan a estas parejas concebir y tener descendencia. Sin embargo, aún son pocos los estudios destinados a esclarecer la causa de la infertilidad en parejas que presentan abortos de repetición (Stephenson *et al.*, 2002; Shah *et al.*, 2003; Sierra y Stephenson, 2006).

De entre las posibles causas conocidas del aborto espontáneo (revisadas en Stirrat, 1990b) se han descrito infecciones (Oakeshott *et al.*, 2002; Ugwumadu, 2002), trastornos genéticos (Tavormina *et al.*, 1995; Lanasa *et al.*, 1999; Uehara *et al.*, 2001; Shah *et al.*, 2003), anatómicos maternos (Romer *et al.*, 1996), trombofílicos (Alonso *et al.*, 2002; Dille *et al.*, 2002; Finan *et al.*, 2002; Sarig *et al.*, 2002), hormonales (Vaquero *et al.*, 2000; Matalon *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2002) o inmunológicos (Makino, 2002; Tincani *et al.*, 2003) y anomalías cromosómicas (figura 1), siendo estas últimas responsables de más del 50% de las pérdidas que acontecen durante el primer trimestre de gestación (Hassold *et al.*, 1980).

### Tipos de alteraciones cromosómicas



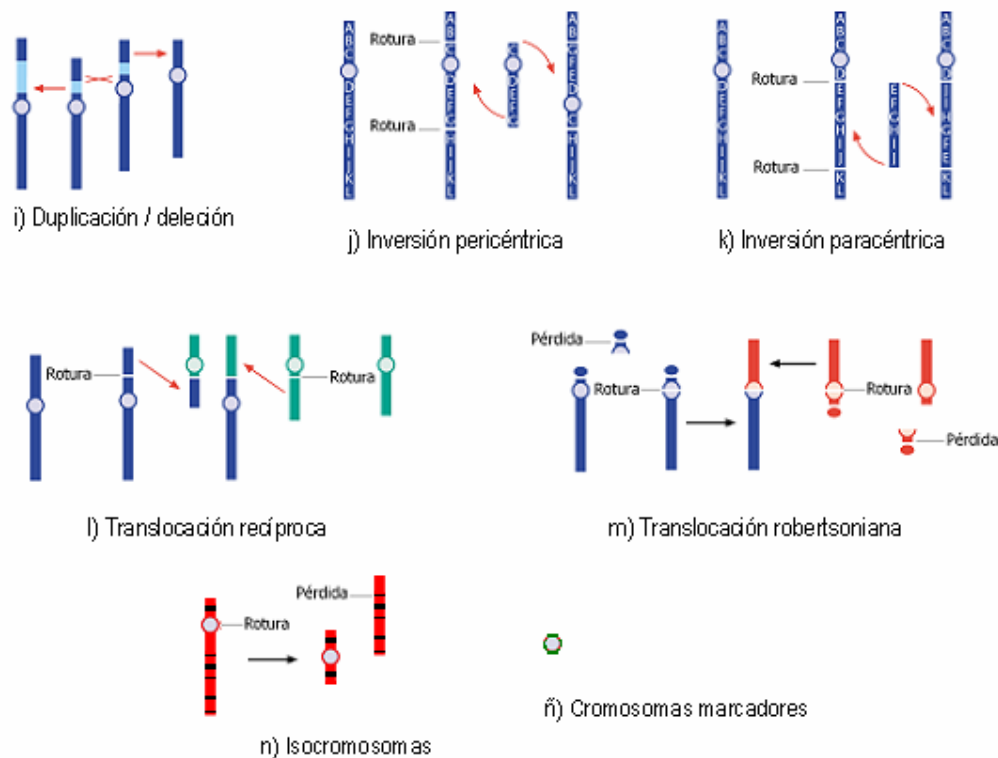


Figura 1. Alteraciones cromosómicas numéricas (*a-d*), disomía uniparental (UPD) (*e*), alteraciones estructurales (*f-n*) y cromosomas marcadores (*ñ*) (modificado de Moore y Best, 2001).

Dentro de las alteraciones numéricas, las aneuploidías consisten en la ganancia (*a*, trisomía) o pérdida (*b*, monosomía) de uno o más cromosomas resultando en una dotación cromosómica no múltiple del número haploide (*n*) en la célula. Por su parte, las poliploidías se refieren a la presencia de uno o más juegos haploides completos de cromosomas extra. La triploidía (*c*) ( $3n$ ) puede ser tanto digínica (origen materno) como diándrica (origen paterno); en el caso de las de origen materno, ésta puede bien ser debida tanto a errores en la primera división meiótica como en la segunda. En el caso de las paternas, suelen ser el resultado de la fecundación de un óvulo por dos espermatozoides (diándrica dispérmica) o por la fertilización del óvulo por un gameto diploide (diándrica monospérmica). En rasgos generales, el fenotipo digínico triploide se caracteriza por un retraso en el crecimiento asimétrico severo que hace que la cabeza presente un tamaño anormalmente superior con respecto al del cuerpo, ambigüedad genital, sindactilia del tercer y cuarto dedo y placenta extremadamente pequeña entre otras anomalías. Por su parte, el fenotipo diándrico presenta un no tan acusado retraso del crecimiento siendo éste simétrico y una placenta anormalmente grande. La tetraploidía (*d*) ( $4n$ ) se produce por un error en la división del embrión tras la fecundación (con el resultado de complementos cromosómicos sexuales XXXX o XXYX) o por la fecundación de un óvulo por tres espermatozoides (XXXX, XXXY, XYYY o XYYY).

Las células con disomía uniparental completa (*e*) presentan un complemento cromosómico equilibrado desde el punto de vista numérico pero desequilibrado en cuanto a contribución parental, puesto que la pareja de cromosomas homólogos procede del mismo progenitor. Los mecanismos por los que ésta se produce pueden ser el rescate de la trisomía (pérdida de un cromosoma extra al azar en un embrión trisómico, apareciendo generalmente mosaicismo de la trisomía confinado a la placenta) o compensatorios (la falta de un cromosoma es compensada con la copia de su homólogo). Así, si en la UPD encontramos los dos homólogos distintos de un mismo progenitor hablaremos de heterodisomía (*e*, *centro*) o de isodisomía (*e*, *derecha*) si por el contrario los dos homólogos son copia el uno del otro. Las consecuencias de la UPD son la posible transmisión de dos copias de una mutación recesiva proveniente de un progenitor portador o la presencia de anomalías debidas al *imprinting* genómico (expresión diferencial de determinados genes dependiendo del progenitor de origen).

Las anomalías cromosómicas estructurales ( $f-n$ ), cuya incidencia en abortos espontáneos se estima en algo más del 4% y en 1 de cada 400 recién nacidos vivos, son debidas a la rotura de uno o más cromosomas o a fenómenos de sobrecruzamiento desigual, que afectan al contenido y a la forma de los cromosomas, además de en ocasiones alterar la distribución, expresión y dosis de los genes en el genoma. Estos eventos pueden llevar a distintos tipos de alteraciones y reordenamientos, que si resultan en la pérdida o ganancia de material cromosómico se consideran desequilibrados, o equilibrados si por el contrario no resultan alterados ni el contenido ni la expresión génica. Además, pueden ser heredadas o aparecer *de novo*, condición que incrementa el riesgo de aparición de trastornos genéticos incluso cuando aparentemente se muestran como equilibradas, debido a la posible disrupción de genes o a la presencia de deleciones o duplicaciones submicroscópicas en los puntos de rotura que afecten a genes o a *clusters* enteros de éstos. Dentro de las alteraciones estructurales encontramos los siguientes tipos:

-Deleciones ( $f-h$ ): consisten en la pérdida de cromatina de un cromosoma, lo que resulta en una monosomía parcial de una región o regiones cromosómicas. Mientras que las roturas simples provocan deleciones terminales ( $f$ ), las deleciones intersticiales ( $g$ ) se producen mediante rotura por dos puntos, seguida de la pérdida de la región intersticial y la posterior unión de los dos segmentos restantes. Los cromosomas en anillo ( $h$ ) se forman mediante rotura en cada brazo cromosómico y posterior fusión de los extremos con pérdida de los segmentos terminales. Otro mecanismo de formación demostrado en contados casos (Vermeesch *et al.*, 2002) es la fusión de los telómeros, sin pérdida de eucromatina. Los anillos cromosómicos son mitóticamente inestables debido a problemas mecánicos durante la replicación, por lo que suelen aparecer en mosaico.

-Duplicaciones ( $i$ ): son reordenamientos desequilibrados que resultan en trisomía parcial de algún segmento cromosómico. Se cree que el mecanismo de formación de éstas es el resultado de un fenómeno de sobrecruzamiento desigual, mecanismo responsable también de algunas deleciones intersticiales, especialmente en regiones del genoma donde aparecen secuencias de ADN repetido.

-Inversiones ( $j, k$ ): se producen mediante dos roturas en el mismo cromosoma e intercambio de los dos extremos. Pueden ser pericéntricas ( $j$ ) (cuando las roturas aparecen en los dos brazos del cromosoma y por tanto el centrómero está incluido en el segmento invertido) o paracéntricas ( $k$ ) (cuando las dos roturas se producen en el mismo brazo). En algunos casos son consideradas polimorfismos (o heteromorfismos) debido a su elevada frecuencia poblacional y a la aparente ausencia de repercusión fenotípica (aunque sí en algunos casos se postula que puedan influir negativamente sobre la fertilidad, como es el caso de la inv(9) pericéntrica cuya frecuencia se estima en torno al 1% de la población) (Uehara *et al.*, 1992; Collodel *et al.*, 2006).

-Las translocaciones ( $l, m$ ) conllevan roturas en dos cromosomas distintos e intercambio de segmentos entre éstos. Las translocaciones recíprocas ( $l$ ) se caracterizan por un intercambio de cromatina entre cromosomas distintos. Se produce una única rotura en cada cromosoma y el posterior intercambio de los segmentos que carecen de centrómero. Por su parte, las translocaciones Robertsonianas ( $m$ ) resultan de la fusión centromérica de los brazos largos de dos cromosomas acrocéntricos, con pérdida de los brazos cortos o satélites, reduciendo así el número de cromosomas a uno.

-Isocromosomas ( $n$ ): consisten en la copia idéntica de un brazo cromosómico con la ausencia total del otro.

-Por último, los cromosomas marcadores, microcromosomas o sSMC (*small Supernumerary Marker Chromosomes*) ( $\bar{n}$ ), se definen como cromosomas estructuralmente anómalos que no pueden ser identificados mediante técnicas clásicas de bandedo citogenético y presentan un tamaño inferior o similar al de un cromosoma 20 de la misma extensión metafásica.

Nota: definición de "cromosoma": (del griego "cuerpo que se tiñe", Wadeyer 1888). Constituye el orden superior de empaquetamiento del ADN nuclear, siendo su función conservar, transmitir y expresar la información genética que contiene. Estructura del cromosoma metafásico: constituido por dos cromátidas hermanas, a microscopía óptica se puede observar una constricción primaria o centrómero, formado por ADN altamente repetido alfa (rico en A+T) y que divide cada cromátida en brazo corto ( $p$ ) o largo ( $q$ ). Según la posición relativa del centrómero podemos clasificar los cromosomas en metacéntricos (el centrómero divide al cromosoma en dos brazos aproximadamente iguales), submetacéntricos (existe diferencia de longitud apreciable entre ambos brazos) y acrocéntricos (brazo corto carente de eucromatina y apenas diferenciable como satélite, cromosomas 13-15, 21 y 22). Los extremos de los cromosomas se denominan telómeros, están formados por repeticiones de hexanucleótidos (TTAGGG) que se extienden del orden de 5 a 20 Kb y su función es asegurar la integridad del cromosoma actuando como "caperuza" o extremo sellado. A medida que aumenta el número de divisiones del cromosoma, la longitud de los telómeros se ve disminuida, proceso relacionado con el mecanismo de envejecimiento celular.



Las anomalías cromosómicas pueden resultar en fracasos durante el desarrollo embrionario o incluso en estadios más tempranos tras la fecundación (Benkhalifa *et al.*, 2003, 2004; Kahraman *et al.*, 2004), además de -en el caso de los embarazos molares- constituir un elevado riesgo de desarrollo de enfermedad trofoblástica gestacional (Ezpeleta y Cousillas, 2002) debido a la proliferación incontrolada e invasividad del medio intrauterino por tejido trofoblástico anómalo. Se ha postulado que además estas alteraciones puedan afectar a la proliferación celular y a los procesos de apoptosis durante la diferenciación de las vellosidades coriales (Qumsiyeh *et al.*, 2000), habiendo intentado establecer alguna relación entre la morfología de éstas y el tipo de desequilibrio cromosómico (Warburton *et al.*, 1991). En el caso concreto de las molas hidatidiformes, la correcta distinción entre mola parcial y mola completa (figura 2) resulta esencial en el diagnóstico debido al diferente pronóstico asociado a cada una de ellas y consecuente tratamiento necesario.

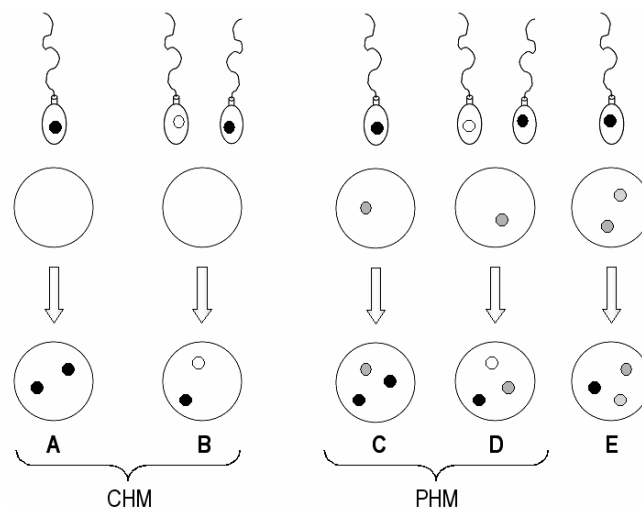


Figura 2. Mecanismos de formación de las molas hidatidiformes:

Mola Completa (CHM)  $\Rightarrow$  (A) Mola monospermica u homocigota (46,XX); proceso resultante de la fertilización de un oocito vacío (el núcleo del óvulo puede estar tanto ausente como inactivado) por un espermatozoide haploide (23,X o 23,Y) seguido de la duplicación de los cromosomas paternos (representa el 75-80% de las molas completas). Las molas 46,YY nunca han sido descritas probablemente debido a la inviabilidad de tal condición. No existe evidencia de que la fertilización por un espermatozoide diploide originado por la no disyunción en meiosis pueda constituir otro mecanismo responsable de la formación de éstas. (B) Mola dispérmica o heterocigota (46,XX o 46,XY), resulta de la fertilización de un oocito anucleado por dos espermatozoides haploides (23,X o 23,Y) (20-25% de éstas).

Mola parcial (PHM)  $\Rightarrow$  Únicamente causada por una triploidia de origen diándrico (C y D), ya que el origen parental del juego cromosómico extra en una triploidia determina el fenotipo y desarrollo del feto y la placenta. Mientras que la triploidia diginica (E) conlleva retraso en el crecimiento fetal y un desarrollo aparentemente normal de la placenta, la triploidia diándrica muestra un crecimiento fetal normal pero una placenta molar. El cariotipo puede ser 69,XXX, 69,XXY o raramente 69,XYY. La mola parcial puede resultar de la fertilización de un oocito haploide (23,X) por un espermatozoide que duplica su contenido cromosómico tras la fecundación (C) o mediante fecundación por dos espermatozoides (D).

Los primeros estudios cromosómicos en abortos espontáneos de los que se tenga referencia (Penrose y Delhanty, 1961; Menitskii, 1963; Carr, 1963) surgen poco después de que en el año 1956 Tjio y Levan establezcan el número correcto de cromosomas en células somáticas (diploides,  $2n$ ) de la especie humana en 46 (22 parejas de autosomas y el par sexual, siendo éste en hembras XX y en varones XY) (figura 3). La aparición de las técnicas de bandeo cromosómico a principios de los años 70 supuso un enorme avance en el campo de la citogenética para el conocimiento y correcta clasificación de los cromosomas humanos, así como para la detección de alteraciones cromosómicas asociadas a determinados síndromes. En adelante, se sucederán una serie de estudios a gran escala que permitirían establecer la frecuencia de alteraciones cromosómicas en más del 50% de los abortos espontáneos del primer trimestre de gestación (Boue *et al.*, 1975; Creasy *et al.*, 1976; Hassold *et al.*, 1980; Kajii *et al.*, 1980; Ohno *et al.*, 1991). Dentro de éstas, las anomalías cromosómicas numéricas se presentan con mayor frecuencia que las estructurales y otras (96% *vs.* 4%), siendo las aneuploidías de los autosomas (en concreto las trisomías) y cromosomas sexuales a su vez más prevalentes que las poliploidías (Hassold *et al.*, 1980; Gueneri *et al.*, 1987; Warburton *et al.*, 1991; Nagaishi *et al.*, 2004) (figuras 4 y 5).

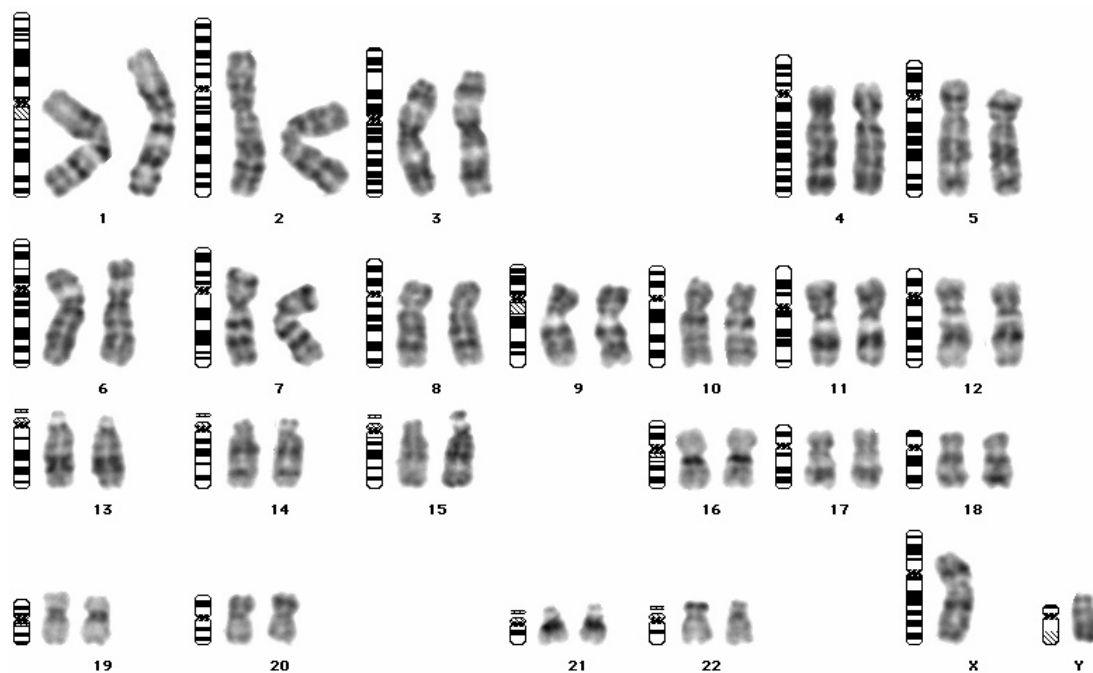


Figura 3. Cariotipo masculino normal (46,XY). A la izquierda de cada par cromosómico, ideograma representando el patrón característico de bandas G ( $\approx 400-450$  bandas). En función de su tamaño, los cromosomas se pueden clasificar en los siguientes grupos: A (1-3), B (4 y 5), C (6-12 y X), D (13-15), E (16-18), F (19 y 20) y G (21, 22 e Y).

Nota: definición de "cariotipo" (constitutivo): complemento cromosómico específico de cada especie definido por el número, tamaño y forma de los cromosomas. El mismo término se emplea para designar la representación de los cromosomas metafásicos (máximo grado de compactación del ADN) convenientemente emparejados y ordenados en función de su tamaño.

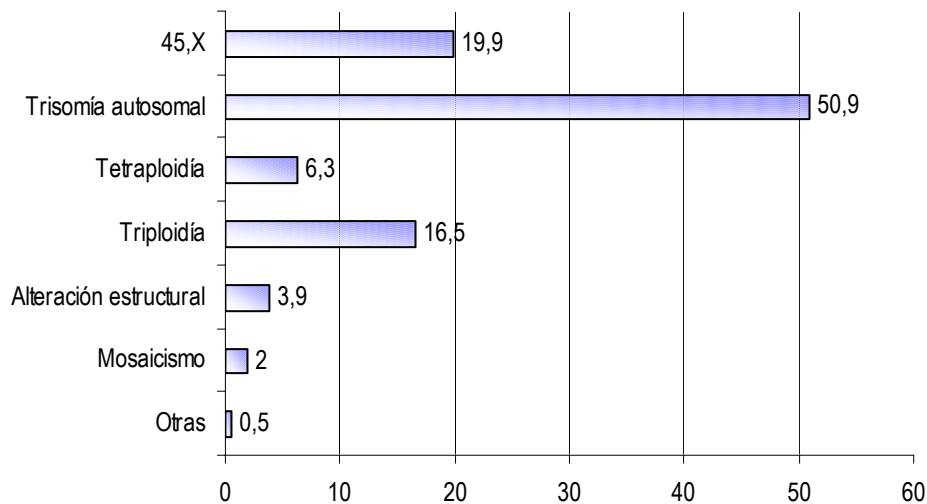


Figura 4. Frecuencia de las distintas alteraciones cromosómicas observada en abortos espontáneos. Datos obtenidos a partir de los estudios llevados a cabo por: Lauritsen *et al.*, 1972; Therkelsen *et al.*, 1973; Boue *et al.*, 1975; Creasy *et al.*, 1976; Hassold *et al.*, 1980 (frecuencias revisadas en Bond y Chandley, 1983, siendo la cohorte heterogénea en cuanto a criterios de selección -como la edad gestacional de las muestras- y el tamaño muestral N=1926).

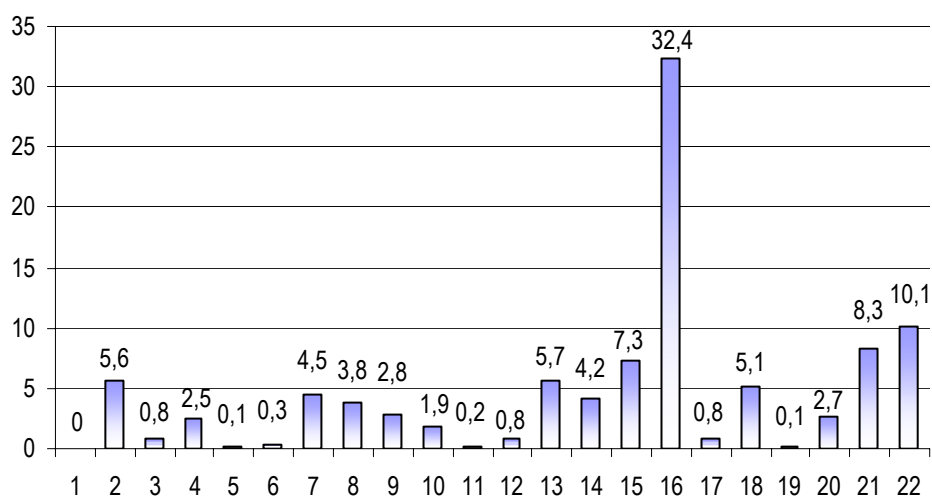
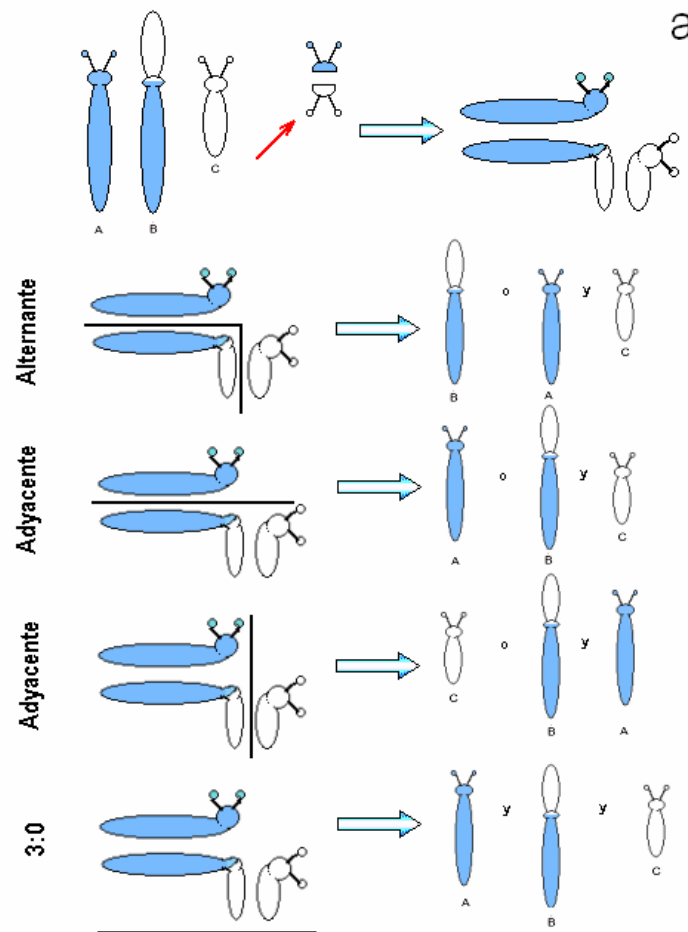
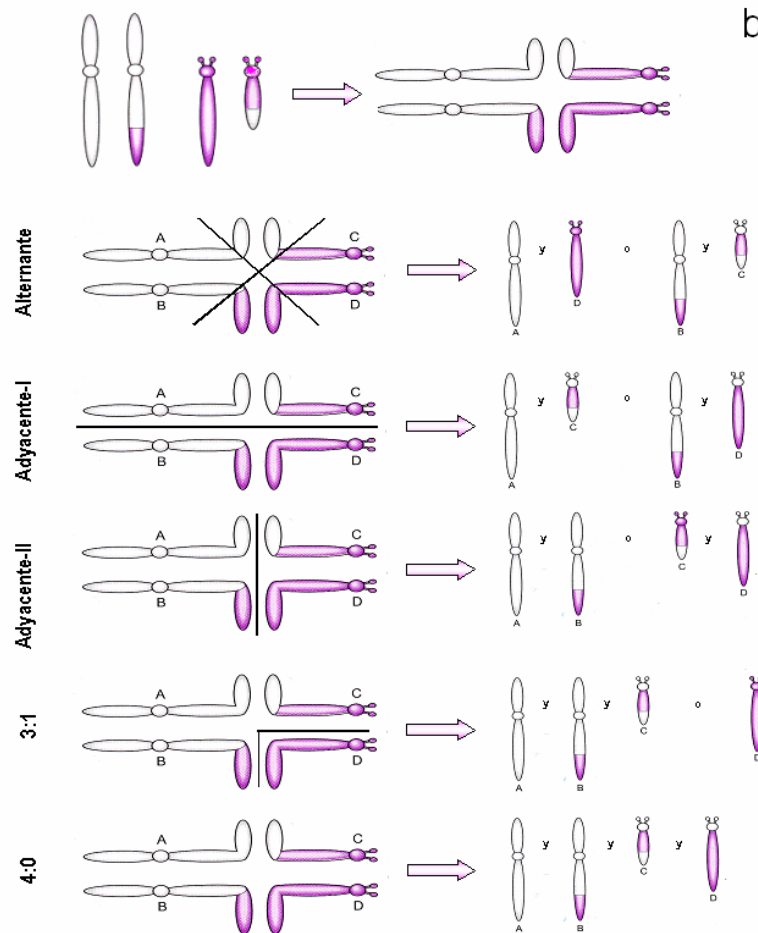


Figura 5. Frecuencia (eje y, %) con la que cada autosome (eje x) se encuentra implicado en las trisomías, según observaciones conjuntas de ocho estudios llevados a cabo entre los años 1976 y 1980 empleando técnicas de bandedo para la identificación cromosómica (frecuencias y autores revisados en Bond y Chandley, 1983, no especificándose edad gestacional de las muestras y siendo el tamaño muestral N=950).

Aunque en la mayoría de los casos el origen de las anomalías cromosómicas es *de novo*, el estudio de los restos abortivos está recomendado incluso en el caso del primer aborto (Sanchez *et al.*, 1999; Silvestre *et al.*, 2002) ya que, en caso de producirse un segundo y habiéndose estudiado cromosómicamente ambos, se podrá precisar con mayor exactitud la probabilidad de que éste se repita ante un nuevo embarazo; ésto es, ofrecer un adecuado consejo genético a estas parejas de cara a futuros embarazos (Carp *et al.*, 2001). Algunos estudios concluyen que la probabilidad de sufrir un aborto con trisomía es mayor que la que correspondería por la edad en mujeres con un aborto trisómico previo a la edad de 30 años o menos (Warburton *et al.*, 2004). Asimismo, el haber presentado un aborto con cariotipo euploide (normal) conlleva peor pronóstico ante un nuevo embarazo (Ogasawara *et al.*, 2000; Morikawa *et al.*, 2004). A su vez, la detección de derivados cromosómicos desequilibrados provenientes de reestructuraciones equilibradas en los progenitores (translocaciones o inversiones) presenta una elevada importancia debido al riesgo de repetición que esta condición implica (figura 6), habiéndose demostrado que en hasta un 9,2% de las parejas que sufre abortos de repetición alguno de los miembros presenta una alteración cromosómica equilibrada (de Braekeleer y Dao, 1990; Stern *et al.*, 1999; Franssen *et al.*, 2005).





Patrón de segregación del trivalente	Cromosomas segregantes	Constitución cromosómica del gameto
2:1		
Alternante	A+C / B	Normal / Translocación equilibrada
Adyacente	A / B+C o C / A+B	Desequilibrado, dando lugar a trisomía / monosomía en el cigoto
3:0	A+B+C / ninguno	Desequilibrado, dando lugar a doble trisomía / monosomía en el cigoto
Patrón de segregación del cuadrivalente	Cromosomas segregantes	Constitución cromosómica del gameto
2:2		
Alternante	A+D / B+C	Normal / Translocación equilibrada
Adyacente-1 (centrómeros no homólogos segregan juntos)	A+C o B+D	Desequilibrado, dando lugar a combinación de monosomía parcial y trisomía parcial en el cigoto
Adyacente-2 (centrómeros homólogos segregan juntos)	A+B o C+D	Desequilibrado, dando lugar a combinación de monosomía parcial y trisomía parcial en el cigoto
3:1		
Tres cromosomas	A+B+C / A+B+D / A+C+D / B+C+D	Desequilibrado, dando lugar a trisomía en el cigoto
Un cromosoma	A / B / C / D	Desequilibrado, dando lugar a monosomía en el cigoto
4:0	A+B+C+D / ninguno	Desequilibrado, dando lugar a doble trisomía / monosomía en el cigoto

**Figura 6.** Durante la gametogénesis, los cromosomas homólogos aparean formando un bivalente para asegurar un reparto de material genético equitativo entre las dos células hijas. En el caso de los individuos portadores de translocaciones Robertsonianas y recíprocas, el apareamiento entre regiones homólogas de los cromosomas conlleva la formación de estructuras complejas (trivalente y cuadrivalente, *a* y *b*, respectivamente) en las que un tipo u otro de segregación determina la constitución cromosómica equilibrada o desequilibrada de los gametos. Estudios recientes en espermatozoides de portadores de diferentes translocaciones sugieren que la frecuencia de los distintos tipos de segregación en el caso de las recíprocas depende del tamaño de los segmentos intercambiados y de la distribución y el número de quiasmas que se establezcan en paquitena (Yakut *et al.*, 2006). Por el contrario, parece demostrado que en el caso de las Robertsonianas predomina la segregación alternante (85% de gametos equilibrados) frente al resto debido al apareamiento preferente de los elementos acrocéntricos en configuración *cis*, siendo la frecuencia de gametos desequilibrados resultantes de la segregación adyacente cercana al 12%, independientemente de los cromosomas implicados en la translocación (Anahory *et al.*, 2005; Moradkhani *et al.*, 2006; Ogur *et al.*, 2006). Asimismo, el riesgo de UPD se ve incrementado en el caso de las translocaciones Robertsonianas entre cromosomas no homólogos detectadas prenatalmente (trisomía completa debida a segregación 3:0 en portador de translocación seguida de rescate de la trisomía) (Shaffer, 2006). No obstante, para ambos tipos de translocación, la viabilidad del cigoto o embrión dependerá del grado de desequilibrio cromosómico presentado, dependiendo éste tanto de los cromosomas implicados en la translocación como de los puntos de rotura y la longitud de los segmentos cromosómicos involucrados (considerando su carga y contenido génico) (ver Ramos Corrales C. 1988, tesis doctoral).

## 1.2 - Antecedentes y situación actual del estudio cromosómico de abortos espontáneos

Tradicionalmente, el estudio cromosómico de abortos espontáneos se ha abordado mediante el cultivo celular de los restos fetales para su posterior cariotipado. No obstante, el estudio citogenético de los restos abortivos en particular presenta ciertas limitaciones, como la elevada tasa de fallo del cultivo celular (10-40%) debido al avanzado estado de maceración (autólisis) de la muestra o contaminación microbiana (Lomax *et al.*, 2000), la dificultad en la obtención de resultados debido a la escasa calidad de las preparaciones obtenidas, el establecimiento de un diagnóstico erróneo debido a la presencia y sobrecrecimiento de contaminación celular materna en el cultivo, reflejado esto en la obtención de un mayor número de cariotipos normales femeninos frente a masculinos (*ratio* M:F<1) y que se han demostrado como falsos cariotipos femeninos normales en un 29-58% de los casos (Bell *et al.*, 1999a), o a la limitada resolución propia del cariotipado (10 Mb). Algunos autores han sugerido que la mayoría de los abortos en los cuales el cultivo celular fracasa presentan alguna alteración cromosómica (Fritz *et al.*, 2001a). Incluso, otros autores sostienen la hipótesis de que el cultivo celular pueda dar lugar a cariotipos normales o a aquellos pocos anómalos que permitan la proliferación celular *in vitro*, sugiriendo que la frecuencia de anomalías cromosómicas no comúnmente observadas mediante técnicas citogenéticas podría ser superior a la descrita hasta el momento (Benkhaila *et al.*, 2005), hecho que justificaría la necesidad de reevaluar la incidencia de anomalías cromosómicas en abortos espontáneos.

La introducción de la técnica de FISH en multiplex sobre núcleos en interfase al diagnóstico de aneuploidías frecuentes en abortos espontáneos (las de los cromosomas 13, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y) solventó en parte las limitaciones derivadas del estudio citogenético propiamente dicho al emplear material fetal no necesariamente cultivado con este propósito y poder determinar en algunos casos (sólo en aquellos que presentaran alguna alteración para los cromosomas estudiados o en el caso de fetos varones) la presencia de contaminación materna (Jobanputra *et al.*, 2002; Lebedev *et al.*, 2004; Vorsanova *et al.*, 2005). No obstante, pese a posibilitar el estudio de hasta cinco cromosomas simultáneamente con una rueda de filtros adecuada gracias a la disponibilidad en el mercado de distintas moléculas fluoróforas, el tiempo requerido para su observación al microscopio de fluorescencia y el elevado coste de las sondas comerciales hacen que no sea la técnica más apropiada para su uso rutinario en el *screening* de aneuploidías en este tipo de especímenes.

A la vista de las limitaciones de las técnicas citogenéticas, se planteó la utilización y validación de nuevas técnicas moleculares para el estudio de alteraciones cromosómicas en abortos espontáneos. La principal ventaja de éstas es el empleo de ADN frente a los cultivos celulares, sin requerir por tanto la viabilidad del material objeto de estudio. Esto posibilita realizar el estudio cromosómico en muestras maceradas, fijadas en etanol, formol, o incluso embebidas en parafina, además de en fresco o congeladas. Pese a presentar también ciertas limitaciones, algunas de estas técnicas ya han demostrado

ser métodos fiables para el diagnóstico de aneuploidías y desequilibrios cromosómicos submicroscópicos en abortos espontáneos (Daniely *et al.*, 1998; Bell *et al.*, 2001; Schaeffer *et al.*, 2004; Diego-Alvarez *et al.*, 2005, 2007). En el caso concreto de los mosaicismos cromosómicos, el diagnóstico de éstos se ve fundamentalmente limitado tanto por la prevalencia de cada una de las distintas líneas celulares en la muestra de tejido objeto de estudio como por la sensibilidad de las técnicas empleadas para su detección. Mediante cariotipado se contarán a lo sumo 10 metafases y hasta 20 si se detecta alguna posible alteración, por lo que en ocasiones un mosaicismo en bajo grado podría pasar inadvertido. Por su parte, la técnica de FISH sobre núcleos en interfase permite analizar un mayor número de núcleos de manera más rápida, por lo que hoy en día resulta la técnica escogida para la valoración de este tipo de alteraciones. Sin embargo, algunas de las técnicas moleculares como la QF-PCR o el array CGH ya han sido validadas con esta aplicación (Cirigliano *et al.*, 2004; Donaghue *et al.*, 2005; Ballif *et al.*, 2006a). Los fundamentos y principales aplicaciones de estas técnicas se detallan a continuación.

### 1.3 – Técnicas moleculares para la detección de anomalías cromosómicas

#### 1.3.1 - QF-PCR (*Quantitative Fluorescent - Polymerase Chain Reaction*)

La técnica de QF-PCR, descrita por primera vez en 1993 por Elaine Mansfield, permite la detección de aneuploidías, triploidía y disomía uniparental mediante la amplificación de secuencias de ADN altamente polimórficas presentes en todos los cromosomas (y distribuidas a lo largo de todo el cromosoma) conocidas como regiones microsatélites o STRs (*Short Tandem Repeats*), comúnmente formadas por repeticiones en tándem de uno, dos, tres, cuatro o hasta cinco nucleótidos. El número variable de estas repeticiones conlleva una elevada tasa de heterocigosidad del marcador, tanto intra como interindividualmente (más de 8 y 12 alelos para marcadores muy polimórficos, según el número de veces que estos motivos polimórficos se repitan) (Adinolfi *et al.*, 2000; ver Bustamante-Aragones A. *et al.* 2005, anexo I). Las repeticiones de tetranucleótidos frente a otros motivos (mono, di, tri o pentanucleótidos) son preferentemente escogidas debido a su estabilidad y adecuación para su amplificación mediante PCR y posterior análisis.

El fundamento de la técnica reside en que durante la fase exponencial de amplificación en la PCR, se genera una cantidad de producto directamente proporcional a la cantidad de ADN inicialmente presente en la muestra. Con el propósito de lograr esto, el número óptimo de ciclos de PCR ha de ser limitado, evitando así alcanzar la fase estacionaria o efecto *Plateau*. Se emplean cebadores marcados con fluorocromos, que se incorporarán a los productos de la reacción y serán detectados como picos de diferente tamaño (en pares de bases, pb) e intensidad de fluorescencia (área del pico, en unidades arbitrarias) tras someter el producto de amplificado a electroforesis capilar. Analizando la intensidad de

fluorescencia de los picos seremos capaces de detectar dosis relativas de cada uno de los alelos del marcador. De tal forma, el análisis cuantitativo de éstos permite inferir los siguientes patrones y su interpretación para un marcador STR concreto: a) En individuos normales, dos picos o alelos por cada STR con un *ratio* cercano a 1:1 (patrón disómico dialélico o heterocigoto, dentro del rango 0,8-1,4) o un pico único (patrón monoalélico u homocigoto no informativo, NI); b) En individuos trisómicos, tres picos con un *ratio* aproximado de 1:1:1 (patrón trisómico trialélico), dos picos con *ratio* 2:1 (patrón trisómico dialélico, con un *ratio*  $< 0,65$  o  $> 1,8$ ) o un único pico (patrón monoalélico, NI); c) En caso de monosomía, encontraremos un único pico para todos los marcadores de ese cromosoma (patrón monoalélico, NI) (figura 7).

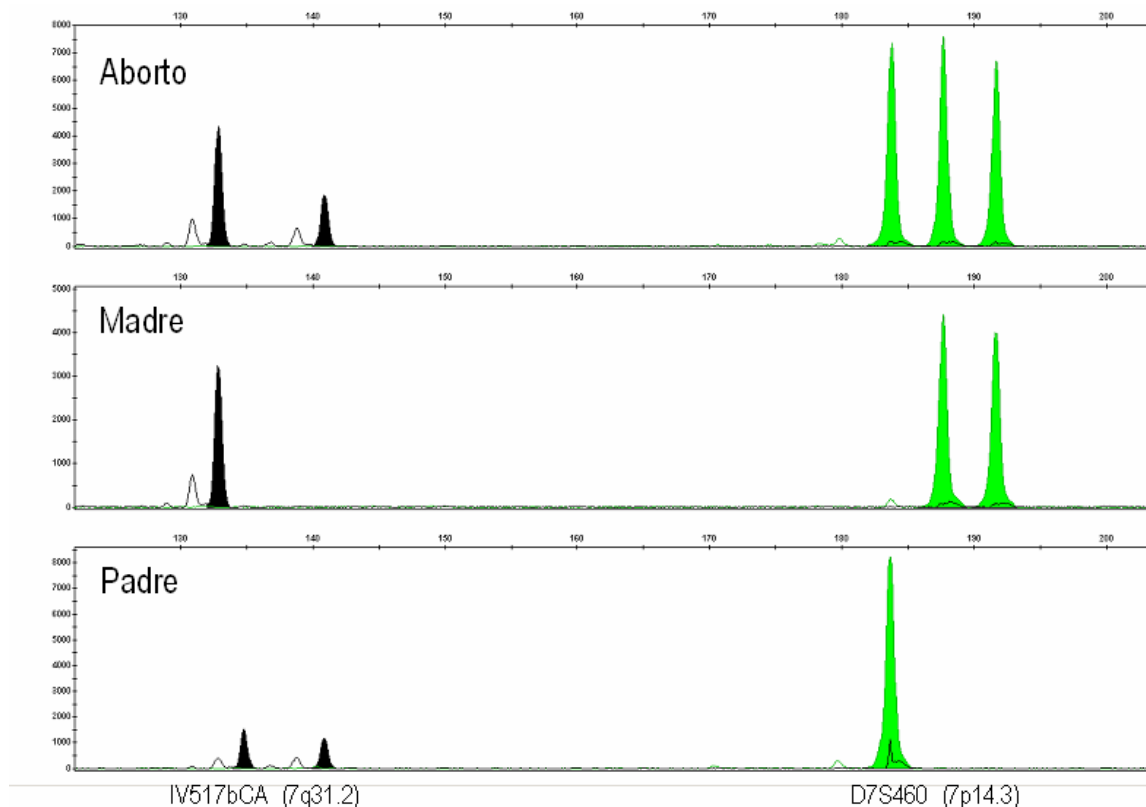


Figura 7. Electroferogramas mostrando el patrón de amplificado de dos marcadores STR del cromosoma 7 mediante QF-PCR en un aborto aneuploide (AB-523) y sus progenitores. El eje *x* representa la longitud de los productos de PCR en pares de bases (pb) determinada por un marcador interno de peso molecular; el eje *y* muestra la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias. La trisomía del cromosoma 7 en el aborto se muestra como patrón trisómico dialélico (2:1) para IV517bCA y trisómico trialélico (1:1:1) para D7S460. La madre presenta un patrón monoalélico (NI) para IV517bCA y disómico dialélico (1:1) para D7S460. Comparando los alelos heredados en el aborto con los de sus progenitores, podemos asumir el origen materno de la aneuploidía.

Debido a la existencia en el mercado de varias moléculas fluoróforas aplicables a esta química (6-FAM, NED, HEX, VIC, ROX, PET), se pueden amplificar y diferenciar entre sí varios marcadores STR en multiplex, lo que posibilita el estudio de aneuploidías de varios cromosomas simultáneamente. De este modo, la triploidía en un espécimen se podría asumir cuando todos los marcadores informativos estudiados y perteneciendo éstos a distintos cromosomas presentan un patrón trisómico de amplificado.



Actualmente, la técnica de QF-PCR es la más extendida en los laboratorios de citogenética (llegando en algunos casos a haber substituido completamente a la técnica de multiplex FISH sobre núcleos en interfase) debido a su rapidez, sencillez, fiabilidad y bajo coste para el estudio rápido de aneuploidías frecuentes en el diagnóstico prenatal (las de los cromosomas 13, 18, 21 y sexuales por ser las menos letales, en ocasiones llegando a término de la gestación) a partir de líquido amniótico o vellosidades coriales (Adinolfi *et al.*, 1997, 2000; Pertl *et al.*, 1997, 1999a, 1999b; Cirigliano *et al.*, 1999, 2001, 2004; Hulten *et al.*, 2003).

Mediante esta técnica además se puede inferir el origen parental y meiótico o mitótico (postzigótico) de la aneuploidía comparando los alelos parentales heredados y sus dosis relativas. La información obtenida de ello puede condicionar el consejo genético ofrecido a la pareja, ya que un error postzigótico se considera un evento “fortuito” con escasas posibilidades de repetición. Para el correcto asesoramiento del origen de las trisomías en concreto, se emplean preferiblemente marcadores cromosómicos pericentroméricos ya que se suponen nulos los fenómenos de sobrecruzamiento y recombinación que se puedan dar en estas regiones, evitando así un diagnóstico erróneo debido a sucesos de recombinación (Robinson *et al.*, 1993). Aunque por sí solos en algunos casos éstos no resultan suficientemente informativos para determinar el origen meiótico de la anomalía, la informatividad de los mismos aumenta si se conoce con certeza el origen parental de la alteración (Chakravarti, 1989). Éste se establece cuando al menos dos marcadores estudiados resultan informativos (Robinson *et al.*, 1999). Se puede determinar un origen meiótico de la aneuploidía cuando se observa un patrón trisómico trialélico. Además, se puede determinar como error en la primera (MI) o en la segunda división meiótica (MII) en función de la reducción o no a homocigosidad de los marcadores pericentroméricos (Chakravarti y Slaugenhaupt, 1987). Por otro lado, un origen mitótico de la aneuploidía puede ser intuido cuando existe un patrón trisómico dialélico para todos los marcadores de un cromosoma estudiados y no se observa una posible recombinación a lo largo de todo el cromosoma. No obstante, la prueba definitiva de un origen somático es imposible de establecer puesto que tanto eventos de recombinación que afecten a todo el cromosoma como la ausencia de recombinación pueden causar que extensas regiones del cromosoma vean reducida su heterocigosidad incluso tratándose de un error de origen meiótico (Robinson *et al.*, 1999).

### 1.3.2 - CGH (*Comparative Genomic Hybridization*)

La CGH es empleada para detectar cambios en el número de copia (deleciones o duplicaciones cromosómicas) a lo largo de un genoma. Descrita por primera vez en 1992 por Kallioniemi y colaboradores, la técnica se basa en la comparación de dos muestras de ADN genómico: una obtenida a partir del tejido objeto de análisis y la otra a partir de un control normal como referencia. Ambos ADNs son diferencialmente marcados con fluorocromos, digeridos y mezclados en proporción 1:1. Posteriormente,

son hibridados sobre preparaciones de cromosomas metafásicos normales en presencia de Cot-1 para bloquear secuencias altamente repetidas (telómeros y centrómeros de los cromosomas). Durante esta cohibridación, ambos ADNs van a competir por hibridar con las secuencias diana de los cromosomas metafásicos; la cantidad relativa de cada tipo de ADN unido a una región cromosómica dada dependerá de la cantidad relativa de esas secuencias en cada ADN. De este modo, las diferencias en intensidad de fluorescencia de los patrones del ADN test y referencia se pueden interpretar como diferencias en el número de copias entre ambos genomas (si el ADN test se marcó en verde y el de referencia en rojo, las regiones normales aparecerán amarillo-anaranjadas, mientras que las pérdidas lo harán en rojo y las ganancias en verde). Así, la presencia y localización de desequilibrios cromosómicos numéricos puede ser detectada y cuantificada analizando el *ratio* de ambos fluorocromos a lo largo de todo el cromosoma utilizando un sistema de captura e integración de imágenes digital (figura 8).

De mayor resolución que el cariotipado convencional (3 Mb), la principal ventaja que presenta esta técnica es que no requiere un conocimiento previo sobre la constitución genética de la muestra objeto de estudio y que el genoma completo es analizado en un único experimento, al contrario que en el caso de otras técnicas moleculares altamente específicas y que analizan regiones muy concretas de genes o de cromosomas de interés. Además, no requiere del cultivo de células de la muestra a testar, permite el estudio a partir de especímenes embebidos en parafina (Bell *et al.*, 2001) y ha sido demostrada una elevada concordancia entre los resultados obtenidos mediante CGH y el cariotipado convencional (Nacheva *et al.*, 1998) para la detección de alteraciones desequilibradas microscópicas. No obstante, esta técnica también presenta ciertas limitaciones, como la imposibilidad para detectar poliploidías (las intensidades de fluorescencia son normalizadas con respecto del complemento cromosómico entero de cada muestra) o reestructuraciones cromosómicas equilibradas. Asimismo, las regiones subteloméricas y pericentroméricas de los cromosomas escapan a la valoración mediante CGH debido a la presencia de secuencias altamente repetidas (secuencias teloméricas, regiones heterocromáticas y ADN satélite tipos I-IV) presentes en todos los cromosomas (Miklos y John, 1979).

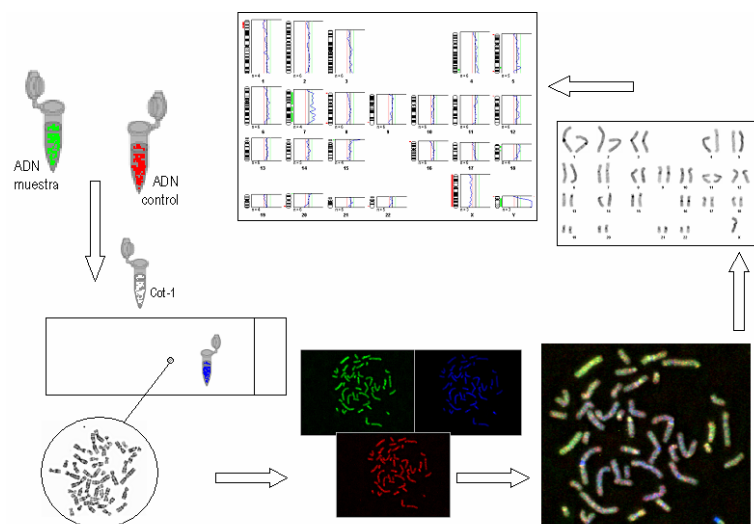


Figura 8. Representación esquemática del protocolo de CGH.

### 1.3.3 - MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

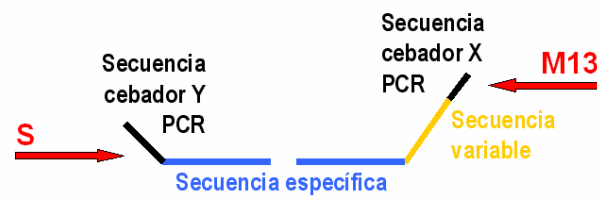
La técnica de MLPA, descrita por Schouten y colaboradores en el año 2002, permite la cuantificación relativa de hasta 46 secuencias distintas de ADN en un rápido, único y sencillo experimento económicamente asumible por cualquier laboratorio de diagnóstico y para el que sólo se requieren 20 ng de ADN como muestra.

Esta técnica se basa en la amplificación de sondas específicas previamente hibridadas a las secuencias diana del ADN. Cada sonda consiste en dos oligonucleótidos, uno sintético y otro derivado del fago M13, que hibridan en zonas adyacentes dentro de la secuencia diana (50 a 70 nucleótidos de longitud) del ADN. Una vez que estas sondas hibridadas son ligadas, se procede a su amplificación mediante PCR con una única pareja de cebadores (todas las sondas contienen secuencias idénticas en sus extremos). Cada sonda da entonces lugar a un producto de amplificado de tamaño único entre 130 y 480 pb (la diferencia de longitud entre dos sondas es de 6-8 pb, aportada por la región de longitud variable del oligo M13) (figura 9). Como la cantidad de cada sonda que es amplificada depende de la cantidad de secuencias diana presentes en la muestra de ADN, es posible la cuantificación relativa de dichas secuencias y por tanto, la detección de cambios en el número de copia de éstas como deleciones (*del*) o duplicaciones (*dup*) (figura 10).

Los kits de MLPA SALSA P036B y SALSA P070 (*MRC-Holland*) contienen 46 sondas diferentes específicas de las regiones subteloméricas de cada cromosoma, además de 2 sondas específicas de secuencias no subteloméricas del cromosoma Y. Las sondas subteloméricas han sido diseñadas para reconocer secuencias diana localizadas en genes correctamente caracterizados situados cerca de los telómeros. En el caso de los cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 y 22), al no poseer secuencias únicas en el brazo corto (*p*), la secuencia de reconocimiento de las sondas superiores se sitúa en uno de los genes más cercanos al centrómero en el brazo largo (*q*) del cromosoma (el nombre de las sondas, el gen detectado y la localización cromosómica se encuentran disponibles en <http://www.mrc-holland.com> y <http://mlpa.omnilounge.co.uk>) (tabla 1).

Estos kits específicos han sido diseñados y validados para el estudio de reordenamientos subteloméricos en pacientes con retraso mental idiopático (Koolen *et al.*, 2004; Palomares *et al.*, 2006). No obstante, mediante el empleo de esta técnica se puede sospechar la presencia de aneuploidía si ambas sondas de cada brazo cromosómico aparecen duplicadas (trisomía) o delecionadas (monosomía). Además, el producto desequilibrado de una translocación recíproca podría dar lugar a monosomía, trisomía o a una combinación de monosomía y trisomía parciales de los segmentos cromosómicos implicados en la translocación, condición susceptible de ser detectada mediante esta técnica.

Esquema sondas:



Reacción:

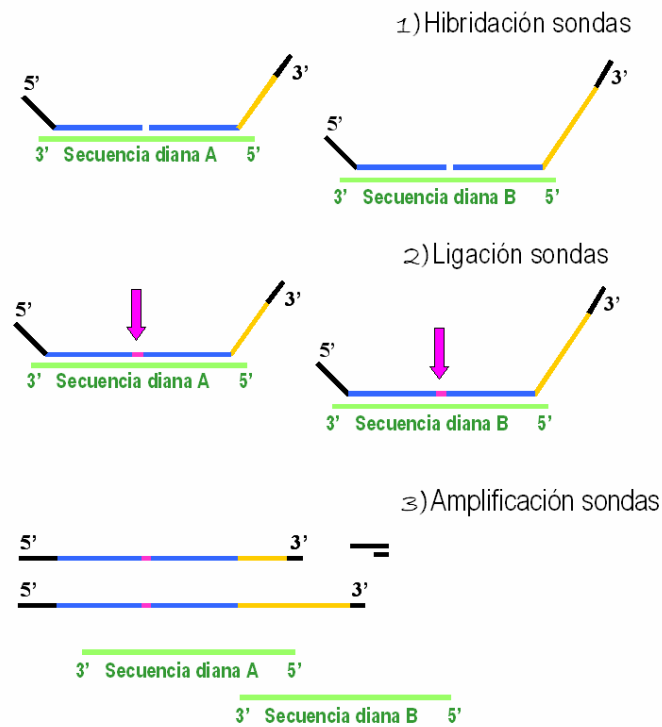


Figura 9. Esquema de las sondas y de la reacción de MLPA (modificado de Schouten *et al.*, 2002).

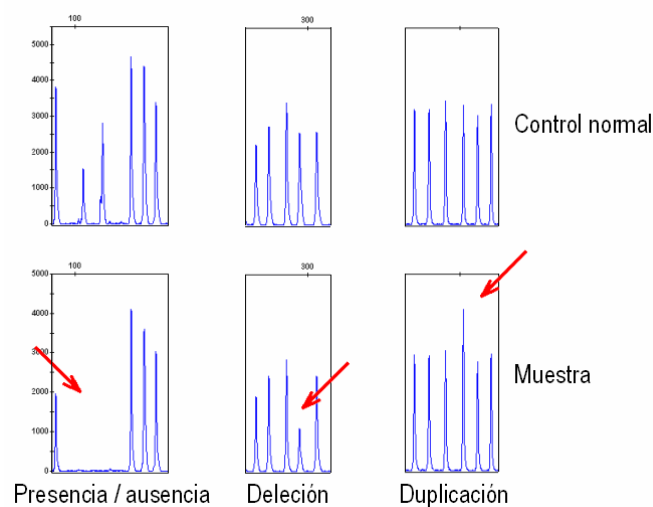


Figura 10. Detección de cambios en el número de copia mediante comparación con el patrón de amplificado de las sondas en una muestra control.

Longitud producto amplificado (nt)	SALSA P036B			SALSA P070		
	Posición cromosómica	Gen detectado	Posición MapView build 35	Posición cromosómica	Gen detectado	Posición MapView build 35
64-70-76-82		DQ Control probes*			DQ Control probes*	
94	2q14	SCP		2q14	SCP	
106	Yq11	UTY	Y-013.9 (no telomérica)	Yq11	UTY	Y-014.5
118	Yq11	DBY (DDX3Y)	Y-013.4 (no telomérica)	Yq11	DBY (DDX3Y)	Y-014.0
130	1p	CAB45**	01-001.20 (= 1.20 Mb desde el telómero)	1q	KIAA1720	01-245.3
137	2p	ACP1**	02-000.26	2q	APG4B	02-242.9
144	3p	CHL1	03-000.32	3q	KIAA0226	03-198.8
151	4p	FLJ20265	04-000.5	4q	FRG1	04-191.6
158	5p	PDCD6	05-000.35	5q	GNB2L1**	05-180.8
165	6p	IRF4	06-000.34	6q	TBP	06-170.7
172	7p	CENTA1	07-000.74	7q	VIPR2	07-158.1
179	8p	FBXO25	08-000.35	8q	RECQL4	08-145.7
186	9p	DMRT1	09-000.9	9q	EU-HMTase1	09-135.9
194	10p	KIAA0934	10-000.5	10q	ECHS1	10-134.7
202	11p	RIC-8	11-000.2	11q	KIAA1030	11-133.3
208	12p	SLC6A12	12-000.18	12q	ZNF10	12-132.0
218	"13p"	PSPC1	13-019.2	13q	CDC16	13-112.9
226	"14p"	HEI10	14-019.9	14q	MTA1	14-103.9
234	"15p"	CYFIP1**	15-020.5	15q	FLJ22604	15-099.9
242	16p	POLR3K	16-000.04	16q	GAS11	16-089.8
250	17p	RPH3AL	17-000.20	17q	SECTM1	17-081.0
258	18p	USP14	18-000.17	18q	CTDP1	18-075.6
266	19p	CDC34	19-000.48	19q	BC-2	19-063.7
274	20p	SOX12**	20-000.25	20q	FLJ20517	20-063.3
282	"21p"	RBM11	21-014.50	21q	S100B	21-046.9
290	"22p"	BID	22-016.61	22q	ARSA	22-049.2
298	X/Yp	SHOX	X/Y-000.57 (PAR region)	Xq (PAR2)	SYBL1	X-153.6
306	1q	KIAA1720	01-245.32 (0.1 Mb desde el telómero)	1p	TNFRSF18**	01-001.0
314	2q	CAPN10	02-241.26 (1.6 Mb desde el telómero)	2p	ACP1	02-000.3
322	3q	BDH**	03-198.76 (1.7 Mb desde el telómero)	3p	CHL1	03-000.3
330	4q	FRG1	04-191.24 (0.2 Mb desde el telómero)	4p	ZNF141	04-000.3
338	5q	GNB2L1**	05-180.60 (0.2 Mb desde el telómero)	5p	LOC133957	05-000.3
346	6q	PSMB1	06-170.76 (0.5 Mb desde el telómero)	6p	IRF4	06-000.3
354	7q	VIPR2	07-158.36 (0.3 Mb desde el telómero)	7p	UNC84A	07-000.6
362	8q	KIAA0150	08-144.64 (1.6 Mb desde el telómero)	8p	FBXO25	08-000.4
370	9q	MRPL41	09-137.72 (0.7 Mb desde el telómero)	9p	FLJ00026	09-000.4
378	10q	PAO	10-135.08 (0.2 Mb desde el telómero)	10p	BS69	10-000.2
386	11q	KIAA0056	11-133.57 (1.2 Mb desde el telómero)	11p	BET1L	11-000.2
394	12q	ZNF10	12-132.33 (0.2 Mb desde el telómero)	12p	RBBP2	12-000.3
402	13q	F7	13-112.81 (1.3 Mb desde el telómero)	"13p"	PSPC1	13-018.0
410	14q	MTA1	14-104.99 (1.3 Mb desde el telómero)	"14p"	ADPRTL2	14-018.8
418	15q	ALDH1A3	15-099.26 (1.0 Mb desde el telómero)	"15p"	NDN	15-021.5
426	16q	GAS11 / GAS8	16-088.62 (0.2 Mb desde el telómero)	16p	DECR2	16-000.4
434	17q	TBCD	17-078.4 (0.5 Mb desde el telómero)	17p	RPH3AL	17-000.2
442	18q	FLJ21172	18-075.9 (0.2 Mb desde el telómero)	18p	THOC1	18-000.2
450	19q	BC-2	19-063.75 (0.9 Mb desde el telómero)	19p	PPAP2C	19-000.2
458	20q	OPRL1	20-062.19 (0.2 Mb desde el telómero)	20p	FLJ22115**	20-000.3
466	21q	HMT1	21-046.9 (0.1 Mb desde el telómero)	"21p"	STCH	21-014.7
474	22q	RABL2B	22-049.5 (0.1 Mb desde el telómero)	"22p"	IL17R	22-016.0
482	X/Yq	SYBL1	X/Y-154.7 (PAR 0.1 Mb desde el telómero)	Xp (PAR1)	SHOX	X-000.5

Tabla I. Kits de sondas SALSA P036B y SALSA P070. \*DQ (DNA Quantity) Control probes: sondas control no dependientes de ligación; indican la cantidad de ADN empleada en el ensayo para alertar cuando la cantidad de ADN usada es menor de los 20 ng requeridos para la obtención de resultados fiables. SCP (Synthetic Control Probe) es dependiente de ligación; su producto de amplificado debe ser de similar tamaño al de la mayoría del de las sondas específicas. \*\*Sondas que han sido observadas alteradas en individuos normales (ver página web de MRC-Holland).

### 1.3.4 - Array based CGH

Ideada por Solinas-Toldo y colaboradores en 1997 y llevada a cabo por Pinkel y colaboradores en 1998, constituye hoy en día la mayor revolución en el campo de la citogenética, tanto constitucional como adquirida, habiendo sido ya considerada como la técnica de “cariotipado molecular” (Vermeesch *et al.*, 2005). Basada en el mismo fundamento que la CGH convencional (cohibridación de dos muestras de ADN en proporción 1:1 marcadas con fluorocromos diferencialmente), la técnica de array CGH emplea secuencias de ADN de localización cromosómica conocida fijadas o sintetizadas directamente sobre microarrays como soporte o plataforma (en lugar de cromosomas metafásicos normales) para la detección de deleciones y duplicaciones cromosómicas, lo que conlleva un considerable incremento en la resolución de la técnica. Tras el marcaje de las muestras e hibridación y lavado de la sonda, la intensidad de fluorescencia de ambas muestras por cada punto se registrará mediante un escáner y la interpretación de los resultados con un *software* específico (figura 11).

Existen numerosas plataformas en el mercado proveedoras de arrays muy versátiles que posibilitan desde el estudio de alta resolución de regiones cromosómicas concretas (Maas *et al.*, 2007) hasta los que ofrecen una cobertura global de todo el genoma con distintos niveles de resolución (Erdogan *et al.*, 2007).

Las limitaciones que presenta esta técnica son su incapacidad para detectar alteraciones cromosómicas equilibradas, si bien es cierto que al contrario que en el caso de la CGH convencional, permite el estudio de las regiones subteloméricas y pericentroméricas de los cromosomas además de la detección de ciertas poliploidías (Ballif *et al.*, 2006b). Otras limitaciones en su uso clínico son la necesidad de confirmar los resultados anómalos obtenidos mediante otras técnicas (deleciones mediante FISH y duplicaciones por PCR a Tiempo Real) y la dificultad de interpretar éstos debido a la posibilidad de tratarse de regiones del genoma aparentemente polimórficas en número de copia (*Copy Number Variations*) (Redon *et al.*, 2006).

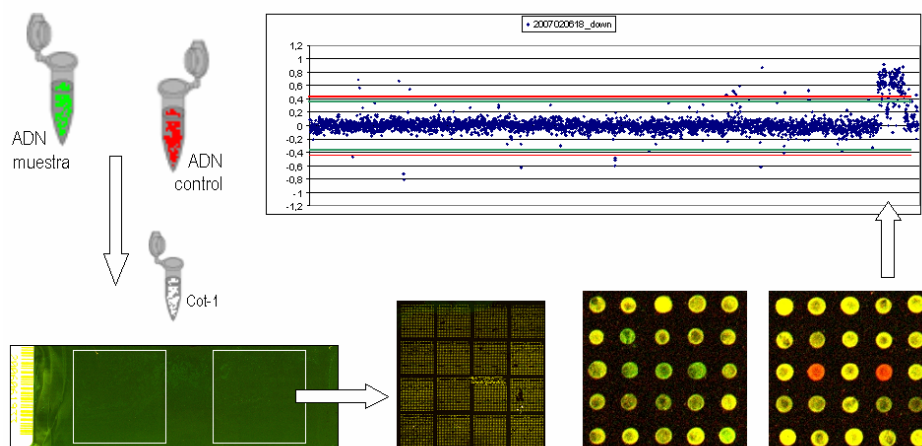


Figura 11. Representación esquemática del protocolo de array CGH.

## 2 – OBJETIVOS

La finalidad última del presente trabajo es ampliar el conocimiento sobre la implicación de las anomalías cromosómicas en la causa de la infertilidad humana, con el objeto de poder ofrecer un apropiado consejo genético y pronóstico frente a nuevos embarazos a parejas con abortos de repetición y problemas de reproducción.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1) Establecer la causa del aborto en aquellos casos en los que el origen de éste sea cromosómico mediante el empleo conjunto de técnicas citogenéticas y moleculares.
- 2) Desarrollar la puesta a punto, validación y valoración de nuevas técnicas moleculares con el fin de incorporar las que proceda a la rutina diagnóstica del laboratorio de citogenética en el estudio de restos abortivos.
- 3) Estudiar el origen de las anomalías cromosómicas en aquellos casos en los que se disponga de ADN de ambos progenitores, con objeto de obtener un mayor conocimiento acerca de los mecanismos responsables de las cromosomopatías.
- 4) Describir el protocolo óptimo a llevar a cabo en el estudio de alteraciones cromosómicas en restos abortivos y parejas con abortos de repetición según la efectividad, viabilidad, coste y fiabilidad de las distintas herramientas empleadas.
- 5) Valorar la necesidad de reevaluar la incidencia de anomalías cromosómicas como causa del aborto en base a los resultados derivados de este estudio y los reportados en la literatura.



## 3 – MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 - Naturaleza y origen de las muestras empleadas en el presente estudio

Las muestras de restos abortivos empleadas en el presente trabajo consistieron en vellosidades coriales, restos fetales o tejido placentario obtenido tras evacuación o legrado de gestaciones interrumpidas entre la cuarta y vigésimo cuarta semana de embarazo (figura 12). En la mayoría de los casos además se extrajo ADN a partir de restos reconocibles de decidua materna para confirmar el origen fetal de las muestras tomadas como tal. Además de restos abortivos, en el presente estudio se analizaron algunas biopsias de vellosidades coriales realizadas previas al aborto y/o legrado y de líquido amniótico en gestantes que se sometieron a un diagnóstico genético prenatal.

Estas muestras han sido remitidas con carácter eventual desde el año 1990 al Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz (Clínica de la Concepción, Madrid, España) por el Servicio de Obstetricia y Ginecología de la misma y algunas clínicas privadas (caso de las interrupciones voluntarias del embarazo -IVE- por malformaciones en el feto observadas ecográficamente) para su estudio cromosómico y, desde mediados de 2005 en adelante de manera rutinaria, (prácticamente) la totalidad de las intervenciones atendidas en la clínica con objeto de disponer de muestras para llevar a cabo los proyectos “Aplicación de nuevas técnicas citogenéticas y moleculares al estudio de abortos y parejas con problemas de reproducción” (PI020068) y “Estudio de la infertilidad: búsqueda de nuevas causas genéticas a través de la aplicación de nuevas técnicas” (PI050263) (figura 13).



Figura 12. Muestra de vellosidades hidrópicas en placa Petri (*izquierda*); feto de 7 semanas de gestación (*derecha*) (AB-759) con cariotipo 48,XXY,+21. El examen macroscópico del feto descarta polidactilia así como sindactilia en el mismo, siendo las vellosidades coriales (no mostradas) aparentemente normales.

Puesto que la fijación del material biológico en etanol, formaldehído o formol imposibilita su estudio citogenético y dificulta los estudios moleculares al alterar la calidad y cantidad del ADN obtenido a partir de este tipo de muestras, el material (tanto de legrados del primer trimestre como de abortos de edades gestacionales mayores) ha de ser preservado directamente o preferiblemente en suero salino

(NaCL 0,9%) a 4°C hasta su procesado. Asimismo, la asepsia en el tratamiento y conservación de la muestra es fundamental para poder establecer el cultivo celular de los restos que, si se descubre contaminado, se desechará de inmediato para evitar la contaminación microbiana de otras muestras. Por ello, el uso de recipientes estériles es recomendado. Tras recibir la muestra, registrarla y procesarla convenientemente para su estudio citogenético y molecular según lo establecido en apartados posteriores y siempre que la cantidad de material biológico remitido lo permitiese (la mayoría de la muestra debía ser remitida al Servicio de Anatomía Patológica para realizar los correspondientes estudios histológicos), parte de éste se conservó en medio completo a 4°C hasta observar crecimiento en el cultivo establecido y otra parte se preservó indefinidamente en tubos de 2 ml a -20°C como reservorio de ADN.

Aunque lo ideal hubiera sido disponer de la mayor cantidad de datos de cada paciente (al menos fecha de nacimiento de ambos miembros de la pareja, historia gestacional, fecha de la última regla o edad gestacional y observaciones ecográficas), en la mayoría de los casos sólo se disponía de la edad materna. En caso necesario, fueron solicitadas muestras de sangre de los padres para extracción de ADN (y realización de cariotipo en caso indicado) para confirmar un diagnóstico (observar modelo de consentimiento informado en el anexo V). Tras la correspondiente validación de los resultados obtenidos, se ofreció a estos pacientes la posibilidad de recibir una consulta de consejo genético.

El presente trabajo cuenta con la aprobación del comité ético del hospital, cumpliendo por tanto con el tratado acordado en 1964 en Helsinki por la Organización Médica Mundial sobre los principios éticos de la investigación en humanos con fines médicos y posteriores revisiones del mismo (2004).

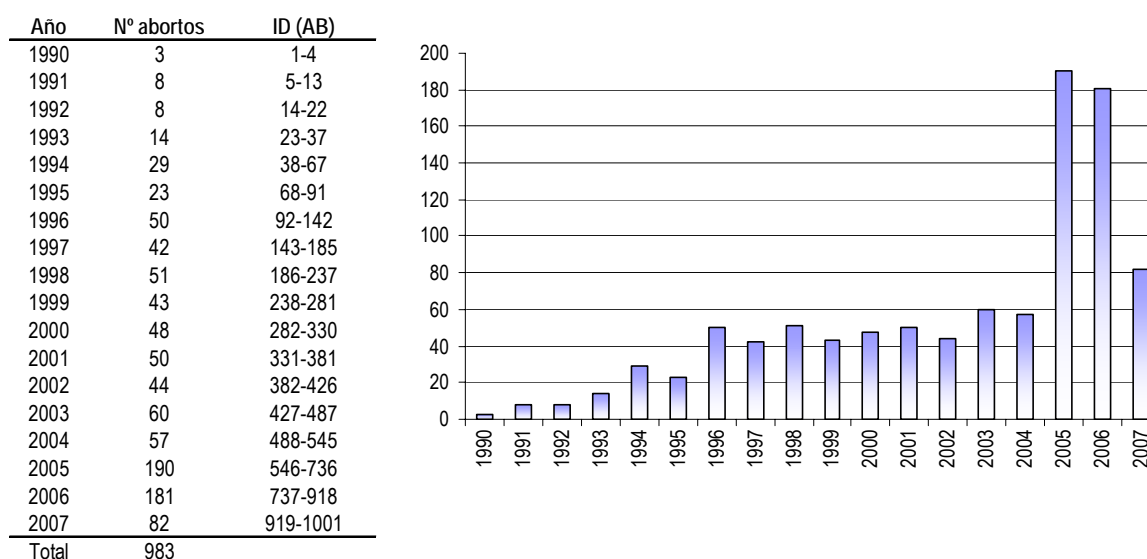


Figura 13. Número de abortos remitidos y estudiados al año en el Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz. Para la realización del presente trabajo se contaba con material congelado (en nitrógeno líquido) de algunas de las muestras previas al año 2003; en adelante, parte del material recibido de cada espécimen fue destinada a la extracción de ADN para la realización de estudios moleculares y otra al cultivo citogenético. Aunque la totalidad de las muestras continúa siendo procesada en el laboratorio, los resultados aquí presentados abarcan hasta la muestra AB-1001, recibida en el mes de marzo del presente año.

El sistema de nomenclatura citogenética empleado a lo largo del presente trabajo responde al establecido en el ISCN (Shaffer y Tommerup, 2005).

### 3.2 - Estudio citogenético

#### 3.2.1 - Procesamiento de los restos abortivos para la realización del cariotipo (400-450 bandas)

##### 3.2.1.1 - Cultivo

Nota: trabajar bajo condiciones estériles (pinzas y tijeras autoclavadas, material estéril desechable y en interior de campana de flujo).

-Tras la limpieza y selección del material a cultivar (vellosidades coriales, cordón umbilical o restos fetales) con suero fisiológico (NaCl 0,9%) en placas Petri, transferirlo a dos tubos truncados de 5 ml con asas de siembra desechables.

-Rotular convenientemente sendos tubos (identificación de la muestra, fecha y número de tubo) e introducir en estufa a 37°C durante  $\approx 45'$  para favorecer la adhesión del material biológico al tubo.

-Añadir 3 ml de medio completo basal BIO-AMF-1 con suplemento (Biological Industries, Israel) conteniendo 1,5 ml de HEPES 1M, 1,5 ml de Penicilina-Estreptomicina y 1,5 ml de L-Glutamina 200mM (GIBCO Invitrogen, CA, USA) previamente atemperado (37°C).

-Incubar durante una semana a 37°C.

-Visualizar la proliferación celular a microscopio invertido, cambiar el medio a ambos tubos e incubar durante una semana más.

-Tras comprobar el estado de proliferación celular, tripsinizar (para levantar las células) uno de los dos cultivos: eliminar medio de cultivo y hacer dos lavados con 1 ml de 0,5% Trypsin-EDTA (GIBCO). Añadir 3 ml más e incubar durante 2-3' a 37°C (hasta comprobar al microscopio que las células se hayan desadherido), transferir la mitad del volumen a un nuevo tubo y detener la acción de la tripsina añadiendo 3 ml de medio de cultivo.

-Incubar durante 24 h a 37°C.

-Cambiar el medio de cultivo en ambos tubos para eliminar los restos de tripsina e incubar (37°C) 72 h más.

-Añadir 0,4 ml de KaryoMAX Colcemid 100  $\mu\text{g/ml}$  (GIBCO) en uno de los tubos, incubar 2 h a 37°C, tripsinizar de nuevo y sacrificar.

### 3.2.1.2 – Sacrificio

- Centrifugar a 2.000 rpm durante 8'.
- Retirar sobrenadante con pipeta Pasteur, resuspender botón celular (vórtex) y añadir 5 ml de choque hipotónico. Vórtex y dejar actuar 5' a temperatura ambiente (TA).
- Centrifugar a 2.000 rpm durante 8'.
- Retirar sobrenadante, resuspender y añadir 5 ml de fijador con agua, vórtex.
- Centrifugar a 2.000 rpm durante 7'.
- Retirar sobrenadante, resuspender y añadir 5 ml de metanol absoluto, vórtex.
- Centrifugar a 2.000 rpm durante 7'.
- Retirar sobrenadante, resuspender y añadir 5 ml de fijador de Carnoy, vórtex.
- Centrifugar a 2.000 rpm durante 7'.
- Retirar sobrenadante, resuspender y añadir 1,6 ml de fijador de Carnoy, vórtex y extensión.

#### Soluciones a preparar:

- Choque hipotónico (KCl al 0,56%, atemperar a 37°C): 0,56 g KCl / 100 ml agua destilada.
- Fijador con agua 100 ml (5 ml Ácido acético 90%, 3 ml metanol, 92 ml agua destilada).
- Fijador de Carnoy (Metanol : Ácido acético 90%; 3:1).

### 3.2.1.3 - Extensión

- Añadir 6-8 gotas del resuspendido anterior con pipeta pasteur desde una altura aproximada de 40 cm, intentando abarcar todo el portaobjetos.
- Fijar al fuego durante 2".
- Dejar secar o envejecer hasta el día siguiente a TA o a 56°C en estufa (si han de transcurrir menos de 24 h hasta su posterior procesado) antes de bandearlos.

### 3.2.1.4 - Obtención de patrón de bandas G para realización del cariotipo

- Partimos de extensiones previamente envejecidas (incubación de los portas extendidos durante 24 h en estufa a 56°C).
- Sumergir el porta en la solución de tripsina (37°C) durante 5".
- Lavar seguidamente en el NaCl.
- Añadir 4 ml de solución de tinción sobre cada porta, dejar actuar 3'.
- Lavar los portas con H<sub>2</sub>O destilada y dejar secar.

Soluciones a preparar:

- Buffer (pH 6,8): disolver 10 tabletas / litro H<sub>2</sub>O destilada
- En 200 ml Buffer (pH 6,8) disolver:
  - 0,80 g NaCl
  - 0,02 g Tritiplex
  - 0,05 g Tripsina
- ⇒ llevar en vaso de precipitado a 37°C
- Disolver 1,8 g NaCl en 200 ml H<sub>2</sub>O destilada (mantener en vaso de precipitado a TA)
- Tinción: 150 mg Leishman (Eosin-polychrome methylene blue) / 100 ml metanol
- Solución de tinción: 1 ml de la solución anterior y 3 ml buffer (pH 6,8) por cada porta a bandear.

### 3.2.1.5 – Visualización al microscopio y cariotipado

Para la realización del cariotipo, y en aquellos casos en los que la calidad de las preparaciones obtenidas así lo permitió, al menos 15 metafases fueron observadas y contadas a microscopía óptica y 2 de ellas fotografiadas mediante el sistema de captura de imágenes Quips CGH/Karyotyper.

## 3.3 - Estudio molecular de alteraciones cromosómicas

### 3.3.1 - Extracción de ADN

#### 3.3.1.1 - Extracción de ADN a partir de restos abortivos (QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAGEN)

- Partimos de 10-25 mg de tejido.
- Disgregar mecánicamente en placa Petri con tijeras y pinzas esterilizadas.
- Añadir suero fisiológico (NaCl 0,9%) y transferir con pipeta Pasteur a eppendorf de 1,5 ml.
- Resuspender mediante vórtex y centrifugar 1' a 8.000 rpm.
- Para muestras fijadas en alcohol o formol, repetir de 3 a 4 veces los lavados con suero fisiológico.
- Eliminar sobrenadante, añadir 20 µl de Proteinasa K y 180 µl de Buffer ATL.
- Vórtex, incubar en estufa a 56°C hasta que el tejido esté completamente lisado (16 h, vórtex entre medias para favorecer digestión).
- Tras la incubación, dar pulso y añadir 200 µl de Buffer AL, vórtex, pulso e incubar durante 10' a 70°C.
- Añadir 200 µl de etanol absoluto, vórtex, pulso y transferir a columnita con tubo de 2 ml.
- Centrifugar 1' a 8.000 rpm.
- Desechar elución, añadir 500 µl de Buffer AW1 y centrifugar 1' a 8.000 rpm.
- Desechar elución, añadir 500 µl de Buffer AW2 y centrifugar 3' a 14.000 rpm.
- Desechar elución y centrifugar nuevamente 3' a 14.000 rpm.

- Pasar columna a tubo limpio (1,5 ml), añadir 200 µl de Buffer AE dejar 5' a TA.
- Centrifugar 1' a 8.000 rpm para eluir el ADN de la columna.
- Comprobar la calidad del ADN obtenido midiendo su concentración, sales y pureza en un espectrofotómetro y testar su integridad en un gel de agarosa al 1%.

### 3.3.1.2 - Extracción de ADN con el BioRobot EZ1 (QIAGEN)

Basado en el aislamiento de ADN mediante digestión de los componentes celulares y posterior lavado de los ácidos nucleicos adheridos a bolitas magnéticas, el producto de elución final está listo para trabajar debido a su concentración (en torno a los 85-90 ng/µl) y elevada pureza. El sistema automatizado dispensa mecánicamente cada uno de los reactivos y soluciones necesarias provistas en un mismo cartucho desechable para cada muestra. El proceso completo requiere en torno a 24' para aislar ADN a partir de muestras de sangre y 15' a partir de una muestra de tejido previamente digerida.

#### - Restos abortivos, cultivos celulares y escobillas bucales:

- Añadir 190 µl de Buffer G2 y 10 µl de la solución de Proteinasa K.
- Mezclar mediante vórtex y aplicar un pulso para asegurar que todo el tejido quede sumergido.
- Incubar en estufa a 56°C hasta que el tejido esté completamente lisado.
- Procesar según instrucciones mostradas en la pantalla del BioRobot EZ1 con la tarjeta y los reactivos especificados en la tabla adjunta.

Nota: para muestras fijadas en alcohol o formol, lavar repetidas veces con suero fisiológico (de 3 a 4 veces) antes de la proceder a su digestión.

#### - Sangre periférica:

- Transferir 350 µl de sangre periférica en EDTA a un tubo truncado.
- Procesar según instrucciones mostradas en la pantalla del BioRobot EZ1 con la tarjeta y los reactivos especificados en la tabla adjunta (tabla II).

Material de partida	Buffer G2	Proteinasa K	56°C	Kit reactivos	Tarjeta extractor
10-15 mg de tejido	190 µl	10 µl	24-48h	EZ1 DNA Tissue Kit	EZ1 DNA Tissue Card
Cultivos celulares	190 µl	10 µl	15'-30'	EZ1 DNA Tissue Kit	EZ1 DNA Forensic Card
Escobillas bucales	190 µl	10 µl	15'-30'	EZ1 DNA Tissue Kit	EZ1 DNA Forensic Card
350 µl sangre periférica	-	-	-	EZ1 DNA Blood 350 µl Kit	EZ1 DNA Blood Card

Tabla II. Condiciones de extracción del ADN con el BioRobot EZ1 según material de partida. Nota: todos los reactivos y el material desechable son provistos en el kit.

### 3.3.2 – Técnicas moleculares

#### 3.3.2.1 - QF-PCR

##### 3.3.2.1.1 - Detección de alteraciones cromosómicas numéricas: ensayo de validación

##### Muestras empleadas y criterios de selección

Con objeto de validar la técnica de QF-PCR para el estudio de alteraciones numéricas se escogieron aleatoriamente 160 muestras de abortos espontáneos comprendidos entre la cuarta y vigésimo cuarta semana de edad gestacional (de media 15 semanas de gestación) de entre aquellas en las que disponíamos de ADN. De los 160 casos, 94 de ellos disponían de estudio citogenético. En los restantes 66 casos no se disponía de cariotipo puesto que en 54 muestras fracasó el cultivo o se contaminó (36,5% de aquellos en los que se procesó muestra para el cultivo) y en 12 casos éste no llegó a establecerse (3 especímenes fueron remitidos en formol, 6 se encontraban en avanzado estado de maceración y otros 3 fueron remitidos para estudio molecular por sospecha de displasia ósea).

El estudio molecular de las muestras se realizó mediante las multiplex A, B, C y D (tabla III) y la amplificación de marcadores microsatélites de otros cromosomas (*Linkage Mapping Sets Medium Density Version 2.5*, Applied Biosystems) en aquellas muestras que así lo indicaran observando el resultado citogenético, así como en aquellas que no presentaban cariotipo pero susceptibles de presentar alguna alteración que involucrara a determinados cromosomas (productos de translocaciones). Las muestras que contaban con estudio citogenético servirían de controles ciegos para confirmar los resultados del estudio molecular.

##### Condiciones

Las PCR multiplex A y B (tabla III) fueron llevadas a cabo en un volumen total de 25  $\mu$ l conteniendo 40-100  $\mu$ g de ADN genómico, 150  $\mu$ M de dNTPs (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA), de 1,26 a 37,5 pmol de cada primer, 1X AmpliTaq Gold Polymerase Buffer (15 mM  $MgCl_2$ ) (Applied Biosystems, Foster City, CA) y 1 U de AmpliTaq Gold Polymerase (Applied Biosystems). Tras desnaturalización a 95°C durante 5', le suceden 25 ciclos de amplificación a 95°C durante 60'', 55°C ( $T_a$  de annealing) 60'' y 72°C 90'', finalizando la reacción (extensión final) a 72°C durante 10' (figura 14).

Las PCR multiplex C y D (tabla III) fueron llevadas a cabo en un volumen total de 15  $\mu$ l conteniendo 40-100  $\mu$ g de ADN genómico, 125  $\mu$ M de dNTPs, de 5 a 10 pmol de cada primer, 1X Taq Polymerase Buffer (15 mM  $MgCl_2$ ) y 1 U de AmpliTaq Gold Polymerase. Tras desnaturalización a 95°C



durante 5', le suceden 10 ciclos de amplificación a 94°C durante 30'', 55°C 30'', 72°C 90'' y 15 ciclos más a 89°C 30'', 55°C 30'' y 72°C 90'', con una extensión final de 7' a 72°C (figura 14).

Un microlitro de producto de PCR por muestra se mezcló con 12 µl de Formamida ultra pura desionizada y 0,5 µl de marcador de peso molecular (GeneScan 400HD [ROX] o 500 LIZ Size Standard dependiendo de la matriz del secuenciador) y sometido a electroforesis capilar en un ABIPrism 3100/3130 Genetic Analyzer. Los resultados fueron analizados con el GeneMapper v3.5 (posteriormente v4.0) software package (Applied Biosystems) (figuras 15 y 16).

En aquellos casos en los que se obtuvieron resultados no informativos (patrón de amplificado monoalélico para ambos marcadores de un mismo cromosoma) o para confirmar la sospecha de trisomía (sólo uno de los dos marcadores informativos y presentando un patrón de amplificado trisómico) se emplearon marcadores adicionales (tabla IV). Éstos fueron amplificados individualmente en un volumen total de 15 µl conteniendo 40-100 µg de ADN genómico, 125 µM dNTPs, 10 pmol de cada primer, 1X Taq Polymerase Buffer (15 mM MgCl<sub>2</sub>) y 0,6 U de AmpliTaq Gold Polymerase con los mismos ciclos que los descritos para las multiplex C y D. La temperatura de *annealing* para D21S1412 fue 58°C.

Todas las PCRs fueron llevadas a cabo en termocicladores GeneAmp PCR System 2400, 2700 y/o 2720 (Applied Biosystems).

# ANEUPLOIDÍAS A, B, C, D

PCR n°:

Fecha:

Volumen de la reacción: 24,6 µl (A y B) / 15 µl (C y D)

Tubo n°	Muestra	Familia n°	Agua (µl)	Buffer 10x + MgC <sub>2</sub> (µl)	dNTPs (µl)	Primers (µl)	Otros (µl)	DNA (µL)	Enzima (µl)
			<b>A/B</b>						
			8.4	3	3	*	-	1	0.2
			<b>C/D</b>						
			2.3	1.5	1.5	*	-	1	0.2

**PCR-A**

AMXY-0.18 µl (1.26 pmol)

D18S535-1.5 µl (6 pmol)

D13S631-1.5 µl (27 pmol)

D21S1414-1.5µl (10.5 pmol)

**PCR-B**

X22-0.5 µl (17.5 pmol)

XHPRT-0.5 µl (7.75 pmol)

D21S1411-0.5 µl (12.5 pmol)

D18S386-1.5 µl (10.5 pmol)

D13S634-1.5 µl (37.5 pmol)

**PCR-C**

DXS8076-1 µl (10 pmol)

D22S689-1 µl (10 pmol)

D16S753-1 µl (10 pmol)

D15S1050-1µl (10 pmol)

**PCR-D**

D16S539-0.3 µl (3 pmol)

D15S123-1.8 µl (18 pmol)

D22S280-1 µl (10 pmol)

DXS1002-2 µl (20 pmol)

**Ciclos A/B**

95° 5'

95° 1' } 25 ciclos

55° 1' }

72° 1' 30" }

72° 10'

4° infinito

2h 10'

**Ciclos C/D**

95° 5'

94° 30" } 10 ciclos

55° 30" }

72° 1' 30" }

89° 30" }

55° 30" }

72° 1' 30" }

72° 7'

4° infinito

Figura 14. Plantilla de PCR de aneuploidías.

Marcador		5'- Fluorocromo	Secuencia primers	Rango alélico (pb)	Heterocigosidad	Repetición nucleotídica	Localización cromosómica
PCR-A							
AMXY	F	6-FAM	5'-CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG-3'	106 (X) / 112 (Y)	—	—	Xp22.1-22.3 / Yp11.2
	R		5'-ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG-3'				
D13S631	F	NED	5'-GGCAACAAGAGCAAACTCT-3'	195-215	0,94	Tetra	13q32.2
	R		5'-TAGCCCTCACCATGATTGG-3'				
D18S535	F	HEX	5'-TCATGTGACAAAAGCCACAC-3'	130-154	0,92	Tetra	18q12.3
	R		5'-AGACAGAAATATAGATGAGAATGCA-3'				
D21S1414	F	6-FAM	5'-AAATTAGTGTCTGGCACCCAGTA-3'	344-364	0,88	Tetra	21q21.1
	R		5'-CAATCCCCAAGTGAATTGCCTTC-3'				
PCR-B							
X22	F	6-FAM	5'-TAATGAGAGTTGGAAGAAA-3'	198-238	0,87	Penta	Xq28 / Yqter
	R		5'-CCCATTGTTGCTACTTGAGA-3'				
XHPRT	F	6-FAM	5'-ATGCCACAGATAATACACATCCCC-3'	280-296	0,85	Tetra	Xq26.1
	R		5'-CTCTCCAGAATAGTTAGATGTAGGTAT-3'				
D13S634	F	NED / 6-FAM	5'-TCCAGATAGGCAGATTCAAT-3'	466-498	0,81	Tetra	13q14.13
	R		5'-CCTTCTTCTTCCATTGATA-3'				
D18S386	F	HEX	5'-TCAGGAGAATCACTTGGAAC-3'	337-389	0,88	Tetra	18q22.1-22.2
	R		5'-TCCATGAAGTAGCTAAGCAG-3'				
D21S1411	F	NED	5'-ATGATGAATGCATAGATGGATG-3'	269-321	0,93	Tetra	21q22.3
	R		5'-AATGTGTGTCCTTCCAGGC-3'				
PCR-C							
DXS8076	F	NED	5'-AACTTAGGATACCCATTATGTG-3'	93-101	0,68	Di	Xq21.1
	R		5'-AGTGCTACCTCCACAACAG-3'				
D15S1050	F	PET	5'-TGGAACATCTGTCATAGTGG-3'	285-297	0,77	Di	15q22.31
	R		5'-TCCCTGTTTAATCATCTTCA-3'				
D16S753	F	6-FAM	5'-CAGGCTGAATGACAGAACA-3'	261-281	0,75	Tetra	16p11.2
	R		5'-ATTGAAAACAACCTCCGTCCA-3'				
D22S689	F	HEX	5'-TATGTACAGACCTGCAACTTGC-3'	205-237	0,73	Tetra	22q12.1
	R		5'-CCTGCCTGCCTATCTATCTG-3'				
PCR-D							
DXS1002	F	6-FAM	5'-CTGCTACCCTTTAGTTCTCTC-3'	266-274	0,7	Di	Xq21.2
	R		5'-TCCATGTTGCTGCGAA-3'				
D15S123	F	NED	5'-AGCTGAACCAATGGACT-3'	188-206	0,73	Di	15q21.1
	R		5'-TTTCATGCCACCAACAAA-3'				
D16S539	F	6-FAM	5'-GATCCCAAGCTCTTCTCTT-3'	145-169	0,79	Tetra	16q24.1
	R		5'-ACGTTTGTGTGTGCATCTGT-3'				
D22S280	F	VIC	5'-GCTCCAGCCTATCAGGATG-3'	216-228	0,79	Di	22q12.3
	R		5'-GATTCCAGATCACAAAAGTGGT-3'				

Tabla III. Marcadores cromosómicos empleados en las multiplex QF-PCR A, B, C y D. F: forward; R: reverse.

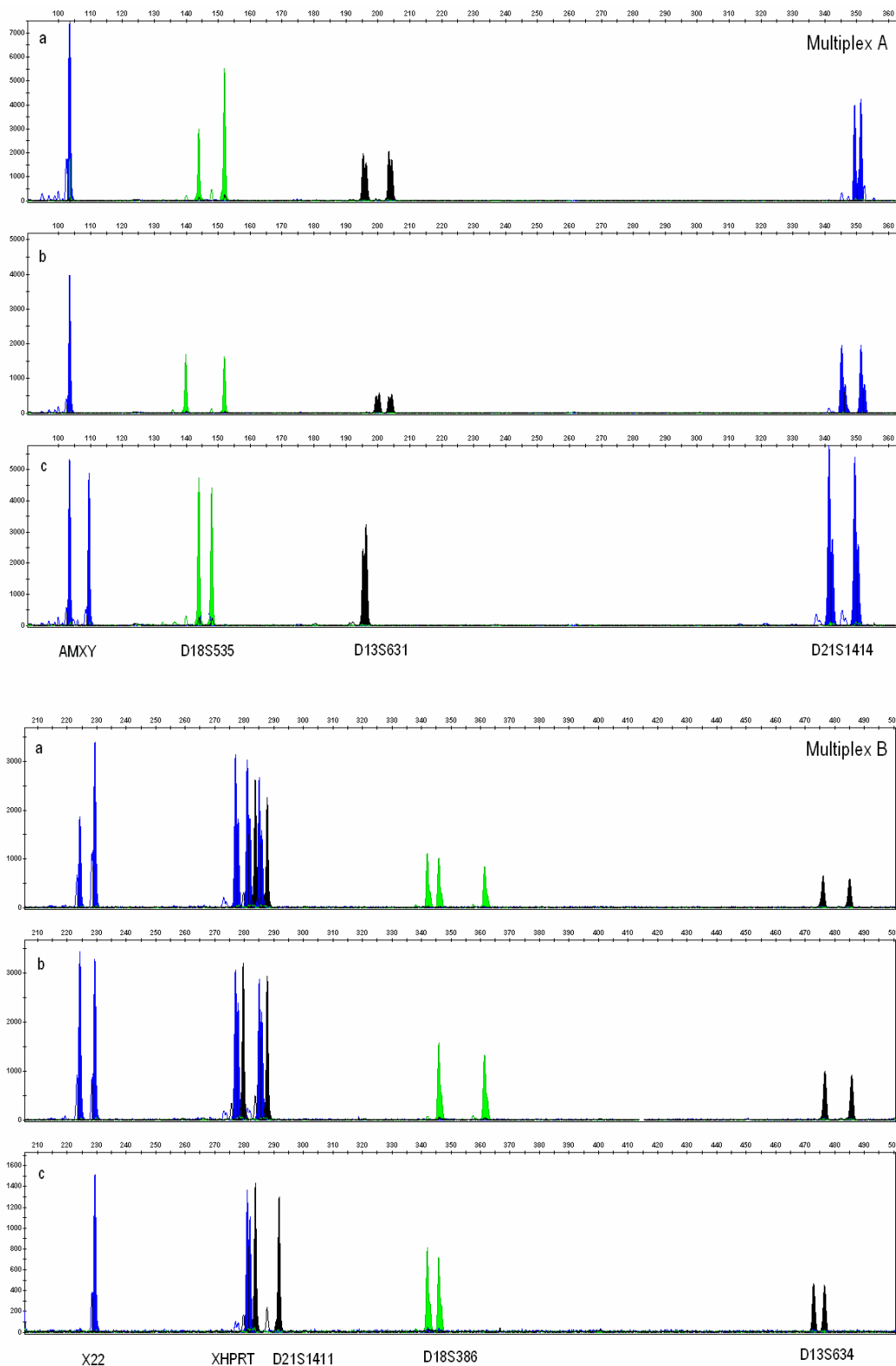


Figura 15. Patrón de amplificado de los marcadores de las multiplex QF-PCR (A y B) en un aborto portador de doble trisomía (+X, +18) y sus progenitores. El eje *x* muestra la longitud de los productos de PCR en pares de bases (pb) determinada por un marcador de peso molecular; el eje *y* muestra la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias. Los electroferogramas muestran los productos de amplificado de las muestras de (a) ADN del aborto, (b) ADN materno y (c) ADN paterno. La trisomía 18 se muestra como patrón trisómico dialélico (2:1) para D18S535 (18q12.3) y trisómico trialélico (1:1:1) para D18S386 (18q22.1-22.2). La trisomía X aparece como patrón trisómico dialélico (2:1) para X22 (Xq28/Yqter), ausencia del amplificado específico del cromosoma Y en AMXY (112 pb) y el patrón trisómico trialélico (1:1:1) para XHPRT (Xq26.1). El origen materno de ambas trisomías puede ser inferido analizando los alelos heredados de cada progenitor.

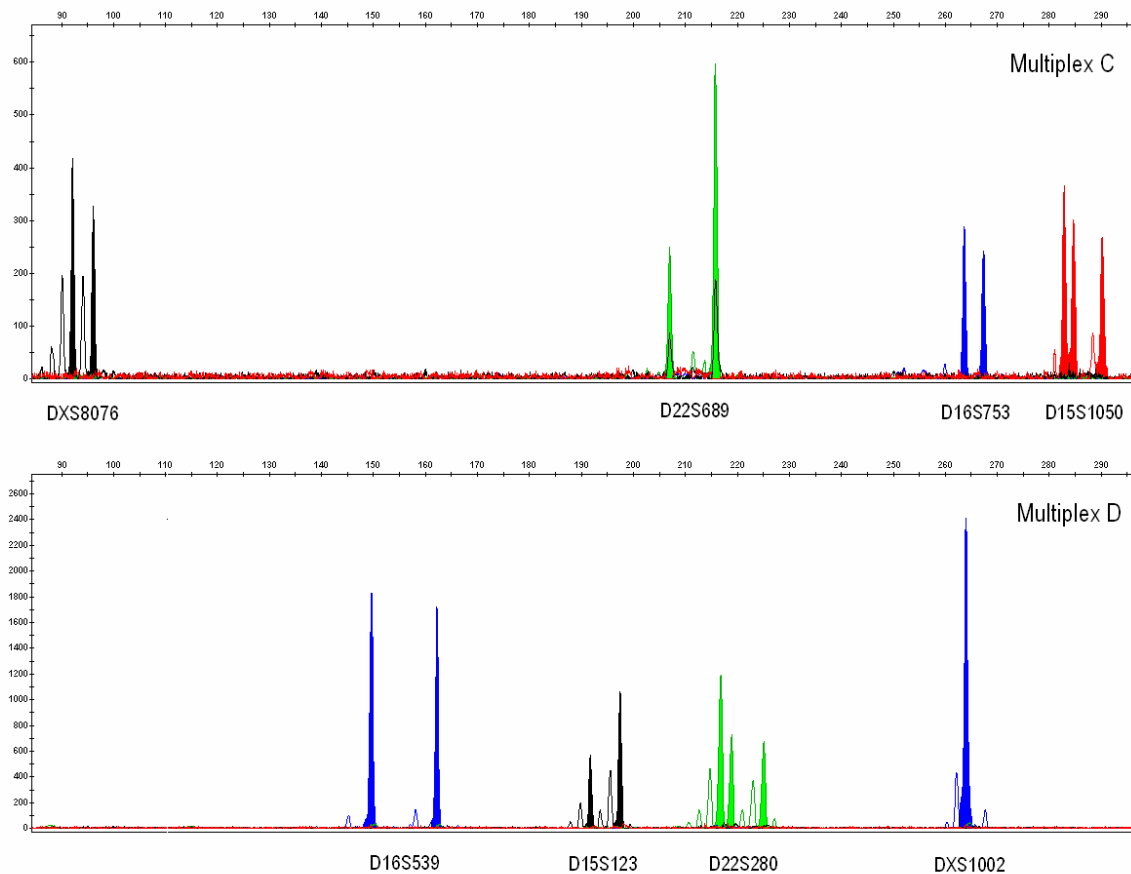


Figura 16. Patrón de amplificado de los marcadores de las multiplex QF-PCR (C y D) en un aborto portador de doble trisomía (+15, +22). El eje  $x$  muestra la longitud de los productos de PCR en pares de bases (pb) determinada por un marcador de peso molecular; el eje  $y$  muestra la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias. La trisomía 15 se muestra como patrón trisómico trialélico (1:1:1) para D15S1050 y trisómico dialélico (2:1) para D15S123. La trisomía 22 aparece como patrón trisómico dialélico (2:1) para D22S689 y patrón trisómico trialélico (1:1:1) para D22S280.

Marcador		Secuencia primers	Rango alélico (pb)	H	Repetición	Localización cromosómica
D13S317	F	5'-ACAGAAGTCTGGGATGTGGA-3'	176-204	0,78	Tetra	13q31.1
	R	5'-GCCCAAAAAGACAGACAGAA-3'				
D13S796	F	5'-CATGGATGCAGAATTCACAG-3'	144-168	0,77	Tetra	13q33.3
	R	5'-TCATCTCCCTGTTTGGTAGC-3'				
D13S797	F	5'-GGTTTGCTGGCATCTGTATT-3'	175-207	0,63	Tetra	13q33.2
	R	5'-TGTCTGGAGGCTTTTCAGTC-3'				
D15S11	F	5'-GACATAGACCACAAAGAAACCTTAGACCAG-3'	246-266	N.d.	Di	15q11.2
	R	5'-GTGTTACTGAGGCAAGAAATGGTGACTG-3'				
D15S125	F	5'-TTCCACACATGACCGC-3'	157-169	0,79	Di	15q22.32
	R	5'-CCCCTGAAGACCGTGA-3'				
D18S1002	F	5'-CAAAGAGTGAATGCTGTACAAACAGC-3'	286-318	0,81	Tetra	18q11.1
	R	5'-CAAGATGTGAGTGTGCTTTTCAGGAG-3'				
D21S11	F	5'-GTGAGTCAATTCCCCAAG-3'	218-238	0,9	Tetra	21q21.1
	R	5'-GTTGTATTAGTCAATGTTCTCC-3'				
D21S1412	F	5'-CGGAGGTTGCAGTGAGTTG-3'	389-429	0,8	Tetra	21q22.2
	R	5'-GGGAAGGCTATGAGGAGA-3'				
D22S264	F	5'-ATTAACATATAAAGGAGCCC-3'	190-210	0,8	Di	22q11.21
	R	5'-CACCCCACAGAGGTATTCC-3'				
D22S1638	F	5'-TCACGCCACTACCCTCCAG-3'	107-109	N.d.	Di	22q11
	R	5'-GACAACAGCAAATGCACATT-3'				

Tabla IV. Marcadores STR adicionales. *F*: forward; *R*: reverse; *H*: heterocigosidad; *N.d.*: no determinado.

### 3.3.2.1.2 - Detección de mosaicismos cromosómicos

#### 3.3.2.1.2.1 - Mosaicismos numéricos en un mismo tejido

##### Ensayo de sensibilidad en la detección de mosaicismos: muestras empleadas y criterios de selección

Para valorar la capacidad de la técnica de QF-PCR para la detección de mosaicismos cromosómicos (en el caso concreto de las aneuploidías) se diseñó un experimento que consistía en amplificar en un mismo tubo dos muestras de ADN distintas (informativas y con alelos de diferente tamaño) en varias proporciones (1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50%). Con tal propósito, se emplearon los marcadores STR del cromosoma 21 D21S11 y D21S1412 por ser tetranucleótidos y una vez conocido el tamaño de los alelos para cada marcador en cuatro muestras control (*DDA*, *EVG*, *MVG* y *RGD*), se escogieron dos para amplificar cada uno de ellos.

##### Resolución de un caso clínico

Con el objetivo concreto de confirmar en distintos tejidos fetales la presencia y grado de una trisomía 9 en mosaico detectada prenatalmente (amniocentesis) en una gestación en la que se observaron sutiles alteraciones ecográficas en la semana 20 de embarazo (AB-506, ver Plaza *et al.*, 2007) y al haber recibido los restos en el laboratorio de citogenética fijados en formol, se procedió a realizar su estudio mediante QF-PCR. Para ello y contando con el ADN de los progenitores, se seleccionaron marcadores microsatélites informativos del cromosoma 9 (D9S1862, D9S886, D9S1845, en este caso dinucleótidos al no disponer de otro tipo en el momento de la valoración). Las muestras de ADN fetales analizadas fueron obtenidas a partir de piel, riñón, hígado y músculo.

Las condiciones de PCR empleadas en ambos casos fueron similares a las de amplificación de marcadores microsatélites individualmente descritas en el presente trabajo (3.3.2.1.1).

#### 3.3.2.1.2.2 - Mosaicismos numéricos confinados a un tejido

El estudio molecular del ADN extraído a partir de diferentes tejidos (vellosidades coriales y feto) de un aborto diferido de la séptima semana de gestación (AB-981) con cariotipo 46,XX de una paciente de 29 años de edad con tres IVEs (todos embarazos no deseados) previas, puso de manifiesto la evidencia de un mosaicismo cromosómico confinado a la placenta. El estudio se realizó mediante análisis de microsatélites y MLPA. Ante los hallazgos moleculares y con objeto de profundizar en el estudio, se solicitó a la pareja una muestra de sangre para extracción de ADN. Desafortunadamente, sólo se dispuso de ADN materno para continuar con el estudio.

### 3.3.2.1.3 - Diagnóstico de molas hidatidiformes

Para la detección de molas hidatidiformes se estudiaron 475 muestras de legrado del primer trimestre mediante las multiplex QF-PCR de aneuploidías descritas anteriormente (3.3.2.1.1).

Los criterios diagnósticos empleados fueron los siguientes:

- Molas completas homocigotas: patrón monoalélico para todos los marcadores cromosómicos, incompatibilidad de herencia materna para uno o varios de los alelos y ausencia del cromosoma Y.
- Molas parciales: patrón triploide compatible con origen diándrico, sospecha ecográfica y/o diagnóstico anatomopatológico de mola.

Los resultados moleculares fueron contrastados con los obtenidos de los análisis histopatológicos realizados en el Servicio de Anatomía Patológica de la Fundación Jiménez Díaz.

### 3.3.2.1.4 - Determinación del origen parental y meiótico / mitótico de la aneuploidia

El origen de la aneuploidia se estudió en 4 abortos que presentaron doble trisomía (AB-407, AB-487, AB-509 y AB-605, ver Lorda-Sanchez I. *et al.* 2004 en el anexo I, Diego-Alvarez *et al.*, 2006 y tabla VIII) y en 5 parejas con dos abortos trisómicos consecutivos estudiados (ver Lorda-Sanchez I. *et al.* 2006 en el anexo I y tabla IX en el apartado 4.1.4 de resultados).

El origen se estudió mediante comparación de los alelos fetales con los amplificados por QF-PCR en muestras parentales. El origen meiótico de la anomalía se estableció en base a la reducción / no reducción a homocigosidad de los marcadores cromosómicos. Para ello, se utilizaron preferencialmente STR pericentroméricos atendiendo a lo expuesto anteriormente en el presente trabajo.

### 3.3.2.2 - CGH

#### Muestras empleadas y criterios de selección

Para poner a punto y validar la técnica de CGH se empleó ADN de 6 muestras previamente cariotipadas (tabla X, apartado 4.2 de resultados). En adelante se analizaron 46 muestras en las que el cultivo celular había fracasado o simplemente no pudo establecerse debido al avanzado estado de maceración de los restos remitidos, incluyendo una muestra en la que se deseaba confirmar hallazgos moleculares previos (AB-525, ver Diego-Alvarez *et al.* 2005b en el anexo I) y otra en la que el padre era portador conocido de una translocación previamente conocida [46,XY,t(2;17)(q32.1;q24.3)] (Lorda-Sanchez *et al.*, 2005).

En aquellos casos que presentaron alteración cromosómica los resultados fueron confirmados mediante QF-PCR y posteriormente MLPA.

### Protocolo

#### 1 - Marcaje del ADN mediante el *CGH Nick Translation Kit* (VYSIS, Inc.)

-Partimos de una solución de ADN (0,2-1 µg/µl) en tampón TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,5) con una pureza ( $A_{260}/A_{280}$ )  $\geq 1,8$ .

-Preparar los siguientes reactivos:

R<sub>1</sub>: 0,2 mM *SpectrumGreen* dUTP: añadir 10 µl de 1 mM dUTP a 40 µl de H<sub>2</sub>O (Vf = 50 µl).

R<sub>2</sub>: 0,1 mM dTTP: añadir 10 µl de 0,3 mM dTTP a 20 µl de H<sub>2</sub>O (Vf = 30 µl).

R<sub>3</sub>: 0,1 mM dNTP mix: mezclar 10 µl de 0,3 mM dATP, 0,3 mM dCTP y 0,3 mM dGTP (Vf = 30 µl).

-Poner un tubo *eppendorf* de 0,5 ml en hielo y permitir que se enfríe.

-Añadir al tubo por este orden los reactivos siguientes: (22,5 – X) µl de H<sub>2</sub>O, X µl de ADN (1 µg de ADN genómico), 2,5 µl de R<sub>1</sub>, 5 µl de R<sub>2</sub>, 10 µl de R<sub>3</sub>, 5 µl de tampón *nick translation* 10X y 5 µl de enzima *nick translation*, haciendo un volumen final de 50 µl.

-Mezclar mediante vórtex, pulso.

-Incubar 3 horas a 15°C.

-Detener la reacción aumentando la Tª a 70°C durante 10' y poner en hielo.

-Comprobar que tras la digestión enzimática se han generado fragmentos de ADN de tamaño óptimo para la hibridación CGH (comprendidos entre 300 y 3000 pb) mediante electroforesis de 9 µl del producto marcado en gel de agarosa al 1%.

#### 2 - Preparación de la sonda:

-Mezclar 20 µl (400 ng) del ADN problema marcado (*SpectrumGreen*), 2 µl (200 ng) de ADN de referencia marcado con *SpectrumRed* y 20 µl de ADN *Human Cot-1*, haciendo un volumen final de 42 µl.

-Añadir 4,2 µl de Acetato sódico 3 M y 115,5 µl de EtOH absoluto para precipitar el ADN.

-Agitar en vórtex, pulso y poner en hielo durante 15'.

-Centrifugar a 12000 rpm durante 30' a 4°C.

-Decantar el sobrenadante y dejar secar el *pellet* (tapa abierta) durante 15' a TA.

-Resuspender el *pellet* en 4,5 µl de H<sub>2</sub>O y 10,5 µl de tampón de hibridación.

-Desnaturalizar la sonda (en el momento antes de proceder a su hibridación) durante 5' a 73°C, parar la desnaturalización en hielo.



### 3 – Hibridación:

- Deshidratar el porta en pases de 2' de EtOH al 70% (-20°C), 85% y 100%. Dejar secar.
- Introducir el porta en la solución de desnaturalización a 70°C durante 3'.
- Volver a deshidratar y dejar secar.
- Añadir 15 µl de sonda previamente desnaturalizada, poner cubreobjetos (24 x 32 mm) y sellar con parafilm.
- Incubar en cámara húmeda a 37°C en oscuridad durante 72 h.
- Solución de desnaturalización: Formamida 70% / 2X SSC (pH 7,0-8,0). Poner en un Coplin 49 ml de formamida, 7 ml de 20X SSC y 14 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Desechar tras un día de uso.

### 4 – Lavados:

- Quitar el cubre y sumergir el porta en Solución de lavado I a 70°C, agitar 1-3" y dejar durante 2'.
- Sumergir el porta en Solución de lavado II a TA, agitar y dejar durante 1'.
- Dejar secar y añadir 10 µl de DAPI II, poner cubre (24 x 60 mm) y secar los bordes.
- Preservar a 4°C en oscuridad hasta su visualización a microscopio de fluorescencia.
- Solución de lavado I: 0,4X SSC / 0,3% NP-40 (pH 7,0-7,5). Añadir 20 ml de 20X SSC a 450 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Añadir 3 ml de NP-40 y disolver completamente. Enrasar hasta un volumen final de 500 ml. Almacenar a TA máximo durante 6 meses.
- Solución de lavado II: 2X SSC / 0,1% NP-40 (pH 7,0-7,5). Añadir 50 ml de 20X SSC a 400 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Añadir 1 ml de NP-40 y disolver completamente. Enrasar hasta un volumen final de 500 ml. Almacenar a TA máximo durante 6 meses.

5 - Captura de imágenes, integración y análisis de resultados mediante el software Quips™ CGH Analysis (VYSIS) según instrucciones del manual.

Nota: los reactivos y productos específicos (VYSIS) necesarios para llevar a cabo el protocolo se detallan a continuación:

- CGH Nick Translation Reagent Kit - Cat. No. 32-801024
- SpectrumGreen™ dUTP (50 nmol) - Cat. No. 30-803200
- SpectrumRed™ Female Reference DNA (100 ng/µl, 25 µl) - Cat. No. 32-804023
- Cot 1 DNA® (250 µl) - Cat. No. 32-800028
- LSI®/ WCP® Hybridization Buffer (2 x 150 µl) - Cat. No. 32-804826
- Normal (46,XY) Metaphase CGH Target Slides (10 Slides) - Cat. No. 30-806010
- DAPI II Counterstain (2 x 500 µl) - Cat. No. 32-804831

## Protocolo simplificado de CGH

Fecha:

## 1 - Nick Translation

Caso	cc DNA (ng/ $\mu$ l)	Pureza	X (DNA) ( $\mu$ l)	Y (H <sub>2</sub> O) ( $\mu$ l)	Resultado CGH	Observaciones

Reactivos (para 6 muestras):

R<sub>1</sub> → 12  $\mu$ l H<sub>2</sub>O + 3  $\mu$ l dUTP = 15  $\mu$ lR<sub>2</sub> → 24  $\mu$ l H<sub>2</sub>O + 12  $\mu$ l dTTP = 36  $\mu$ lR<sub>3</sub> → 21  $\mu$ l dATP + 21  $\mu$ l dCTP + 21  $\mu$ l dGTP = 63  $\mu$ l← X+Y = 22.5  $\mu$ l2.5  $\mu$ l R<sub>1</sub>5  $\mu$ l R<sub>2</sub> → vórtex / pulso → 3h 15°C // 10' 70°C // 4°C ∞ → congel.10  $\mu$ l R<sub>3</sub>→ 9  $\mu$ l Agar. 1%5  $\mu$ l buffer5  $\mu$ l enzimaV<sub>f</sub> = 50  $\mu$ l

## 2 - Preparación de la sonda

→ 20  $\mu$ l← 2  $\mu$ l SpectrumRed → v/p → 15' hielo →  $\varnothing$  30' 12.000 rpm 4°C →  $\varnothing$  15' vacuum →30  $\mu$ l HumanCot14.2  $\mu$ l AcNa 3M105  $\mu$ l EtOH 100%← 4.5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O → 5' 73°C → hielo10.5  $\mu$ l buff.hibr.

## 3 - Hibridación

-Deshidratar portas en pases de 2' de EtOH (70% -20°C, 85% y 100%) → secar

-Desnaturalizar incubando 3' en solución de Formamida a 70°C → volver a deshidratar en 70% -20°C, 85% y 100%) → secar

-Añadir 15  $\mu$ l de sonda previamente desnaturalizada → cubre 24x32 mm → parafilm, incubar a 37°C en cámara húmeda oscuridad ≈72 h

## 4 - Lavados

-Lavar 2' en 0.4 x SSC / 0.3% NP-40 a 70°C

-Lavar agitando 5'-1' en 2 x SSC / 0.1% NP-40 a RT

-Añadir ≈10  $\mu$ l DAPI → cubre 24x60 mm, oscuridad a 4°C

### 3.3.2.3 - MLPA

#### 3.3.2.3.1 - Detección de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales desequilibradas: ensayo de validación

##### Muestras empleadas y criterios de selección

Con objeto de validar la técnica de MLPA con el empleo de kits de sondas subteloméricas (SALSA P036B y SALSA P070) se emplearon 221 muestras de ADN extraído a partir de restos abortivos de gestaciones interrumpidas entre la quinta y la vigésimo cuarta semana. Se disponía de resultado citogenético en 102 de las 221 muestras, usado como control en este estudio.

##### Protocolo (figura 17)

#### 1 - Desnaturalización e hibridación de las sondas:

- Diluir de 20 a 500 ng de ADN en 5  $\mu$ l de agua destilada en tubos de 0,2 ml.
- Desnaturalizar durante 5' a 98°C.
- Atemperar la muestra a 25°C y añadir 1,5  $\mu$ l de SALSA Probe-mix (tapa negra) y 1,5  $\mu$ l de Buffer MLPA (tapa amarilla).
- Mezclar y llevar a 95°C durante 1'.
- Incubar a 60°C durante 16 h.

#### 2 - Ligación de las sondas:

- Preparar el Ligase-mix: 3  $\mu$ l de Ligase-65 buffer A (tapa transparente), 3  $\mu$ l de Ligase-65 buffer B (tapa blanca), 25  $\mu$ l de agua destilada, 1  $\mu$ l de Ligase-65 (tapa marrón), mezclar y conservar en hielo hasta su adición a la muestra.
- Llevar la muestra a 54°C y añadir 32  $\mu$ l del Ligase-mix.
- Mantener durante 15' a 54°C, desnaturalizar a 98°C durante 5' y conservar a 4°C hasta su utilización.

#### 3 - Reacción de PCR:

- Traspasar 10  $\mu$ l del producto anterior a un nuevo tubo.
- Añadir 4  $\mu$ l de 10X SALSA PCR buffer (tapa roja) y 26  $\mu$ l de agua destilada.
- Llevar la mezcla a 60°C y añadir 10  $\mu$ l de Polymerase mix [2  $\mu$ l de PCR primers (tapa morada), 2  $\mu$ l enzyme dilution buffer (tapa azul), 5,5  $\mu$ l de agua destilada y 0,5  $\mu$ l de SALSA Polymerase (tapa naranja).

-Mezclar y amplificar seguidamente mediante PCR.

-Condiciones de PCR: 95°C 30", 60°C 30", 72°C 1' durante 35 ciclos, extensión final de 20' a 72°C y conservación a 4°C.

4 - Separación de fragmentos y cuantificación relativa de los productos de amplificado mediante electroforesis capilar:

-Mezclar 3 µl del producto de la reacción de PCR con 0,5 µl de marcador de peso molecular (GS500LIZ Standard) y 12 µl de Formamida ultra pura.

-Someter a electroforesis capilar en condiciones recomendadas por el fabricante.

Nota: se precisa un termociclador de tapa caliente.

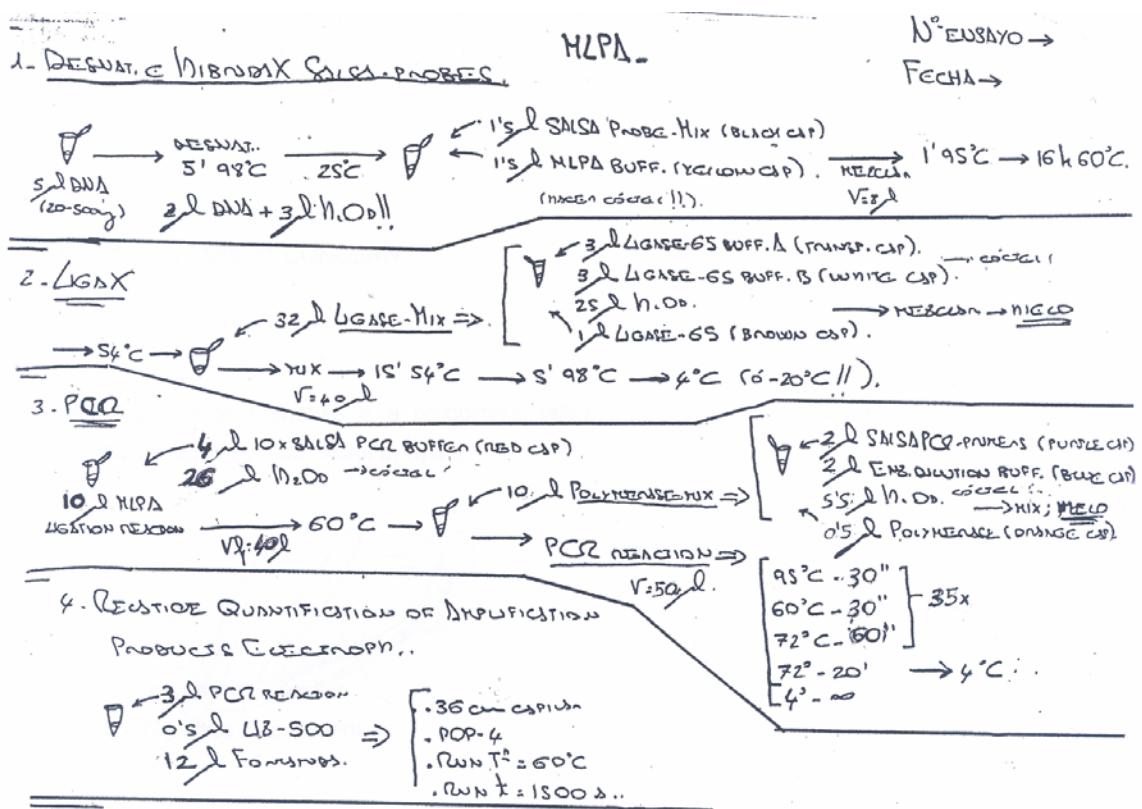


Figura 17. Detalle de esquema simplificado del protocolo de MLPA.

Aunque la detección de duplicaciones o deleciones de las secuencias diana en una muestra comparando el patrón de amplificación de las sondas mostrado en los electroferogramas puede resultar relativamente sencillo (como aumento o disminución del patrón del pico de cada sonda comparándolo con el de un control) si unas pocas muestras son simultáneamente mostradas, los datos deben ser normalizados antes de establecer un resultado. Los valores de área de los picos obtenidos de los productos de amplificación fueron por tanto exportados a una hoja de cálculo de *Microsoft Excel*. La normalización de los datos se estableció dividiendo el valor del área de cada sonda por el valor medio de la señal de ésta y de las cuatro sondas más cercanas para cada muestra y posteriormente, dividiendo éste valor normalizado para cada sonda entre el valor medio de cada sonda obtenido tras la normalización de al menos cuatro controles incluidos en el mismo ensayo (los valores sólo deben ser comparados entre muestras incluidas en el mismo ensayo, debido a la posible variabilidad inter-ensayo). La deleción o duplicación de la secuencia reconocida por cada sonda aparecerá respectivamente como variación de un 35-50% en el área relativa del pico del producto de amplificación obtenido con respecto de una muestra control.

En los casos en los que los resultados entre ambos kits no concordaban, el ensayo fue repetido. Se asumió aneuploidía si ambas sondas de ambos kits para los dos brazos cromosómicos aparecían duplicadas (trisomía) o delecionadas (monosomía). En aquellos casos en los que fue posible, los resultados fueron confirmados mediante otras técnicas moleculares.

#### 3.3.2.3.2 - Detección de mosaicismos cromosómicos

La necesidad de confirmar y valorar mediante distintas técnicas la presencia de un mosaicismo estructural encontrado en un caso de diagnóstico prenatal con el objeto de ofrecer un diagnóstico fiable y preciso nos llevó a la aplicación de la técnica de MLPA con sondas subteloméricas en el caso descrito a continuación (LA-05/514):

El resultado de la amniocentesis (a la que se sometió la paciente por edad materna avanzada) mostró la presencia de una línea celular con un anillo del cromosoma 22, siendo el cariotipo 46,XX[10]/46,XX,r(22)(p11;q13)[19]. Para confirmar los hallazgos citogenéticos se sugirió a la pareja someterse a una funiculocentesis mientras en paralelo, se estudiarían las muestras disponibles mediante otras técnicas para descartar que la alteración fuese debida a un artefacto del cultivo citogenético. Para ello, se extrajo ADN a partir de 1 ml de LA “virgen” (el protocolo de procesado de muestras de LA en nuestro laboratorio contempla la conservación de 1 ml de muestra original a 4°C en cada caso con objeto de poder extraer ADN a partir de éste en caso de necesidad) y de uno de los dos frascos de cultivo. Esperando observar un patrón parcial de deleción (al encontrarse la línea celular con un anillo del 22 en mosaico) en 22q mediante MLPA utilizando el kit de sondas subteloméricas P070, se emplearon 4

controles normales, dos réplicas de la muestra de ADN obtenida a partir del “virgen” y otras dos de la muestra extraída a partir del cultivo como control positivo de la delección en mosaico (ver Rodríguez de Alba M. *et al.* 2006, anexo I).

### 3.3.2.4 - 1 Mb array CGH

#### Muestras empleadas y criterios de selección

Hasta el momento la técnica de array CGH ha sido aplicada en 6 muestras de abortos espontáneos o IVEs que contaban con estudios moleculares y/o citogenéticos previos y una muestra de vellosidades coriales obtenida para realizar estudio citogenético prenatal en un feto con pliegue nuchal de 3,8 mm en la semana 12<sup>+6</sup> (BC-3079). Las observaciones de cada una de las muestras procesadas se detallan a continuación:

-AB-918: IVE en la 14 semana de gestación por alteraciones ecográficas (anencefalia). El resultado del estudio citogenético revela un cariotipo de sexo masculino con trisomía 13.

-AB-555: IVE por hallazgos ecográficos (hidrocefalia, hipoplasia de cavidades izquierdas, labio leporino, fisura palatina y derrame pleural bilateral) en la 19<sup>+6</sup> semana de gestación en paciente de 34 años de edad (G3/P1/A2). El cultivo de los restos abortivos fracasa (muestra en avanzado estado de maceración) y el estudio molecular mediante CGH revela delección terminal del brazo largo del cromosoma 6 [del(6)(q25-qter)]. El estudio de marcadores microsatélites con ADN de los padres revela el origen paterno *de novo* de la alteración y el sexo masculino de la muestra.

-AB-728: gestación interrumpida en paciente de 31 años de edad (G1/P0/A1), 8 semanas de amenorrea. El cultivo celular de vellosidades coriales obtenidas tras legrado fracasa. El estudio molecular de la muestra mediante MLPA con los kits de sondas subteloméricas (P036B y P070) revela una posible delección terminal en el brazo largo del cromosoma 2 (CAPN10 y APG4B) confirmada mediante análisis de marcadores microsatélites (D2S125, 2q37.3) junto con el ADN materno extraído a partir de restos deciduales obtenidos tras legrado.

-AB-740: restos fetales de IVE (22 semanas de gestación) en feto con malformación cerebelosa, sospecha de Síndrome de Dandy Walker (DWS, MIM # 220200) y cariotipo 46,XX.

-AB-899: segundo aborto consecutivo (G2/P0/A2) en paciente de 41 años de edad (primera gestación por FIV), de 5 semanas de gestación, habiendo observado ausencia de tonos fetales y saco vitelino anómalo.

No obtención de metafases para realización del cariotipo. Estudio molecular de aneuploidías mediante QF-PCR (multiplex A y B) revela el sexo masculino de la muestra y trisomía 13.

-AB-950: IVE en la vigésima semana de gestación por agenesia de cuerpo calloso. Paciente de 33 años de edad con un parto normal, un embarazo ectópico y un aborto del segundo trimestre previo con malformación cardíaca. El cultivo de los restos fetales remitidos (cordón umbilical) no prospera. El estudio molecular de éstos mediante QF-PCR descarta triploidia, así como aneuploidías de los cromosomas 13, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y en feto de sexo femenino. El estudio de las regiones subteloméricas de todos los cromosomas mediante MLPA (P036B y P070) descarta la presencia de deleciones o duplicaciones en estas regiones, así como aneuploidías de todos los cromosomas y reestructuraciones cromosómicas terminales desequilibradas.

-BC-3079: el cariotipo (bandas GTG) en cultivo de vellosidades coriales revela una translocación entre los cromosomas 5 y 13 aparentemente equilibrada [46,XX,t(5;13)(p15.1;q34)].

#### Descripción de la plataforma utilizada

El array de 1 Mb sintetizado por VIB MAF (Leuven, Bélgica) contiene 3.527 clones BAC y PAC distribuidos a lo largo de todo el genoma y con una distancia aproximada de 1 Mb entre dos clones adyacentes (Fiegler *et al.*, 2003) espoteados por duplicado sobre portaobjetos o *slides* (para incrementar la fiabilidad de los resultados) y en formato de dos arrays por slide. Tras el marcaje de las muestras e hibridación y lavado de la sonda, se realiza la lectura de la intensidad de fluorescencia de ambas muestras en cada punto mediante un escáner específico. Los datos obtenidos se exportan a una hoja de cálculo de Microsoft Excel (Axon 1 Mb Template, facilitada por J. R. Vermeesch) que, tras realizar las operaciones en ella especificadas, mostrarán gráficamente el logaritmo en base dos del *ratio* de las diferencias en intensidad de fluorescencia obtenida para cada uno de los clones ordenados según su posición cromosómica (de *p* a *q* para cada cromosoma y del cromosoma 1 al 22, X e Y). Se considerará el umbral de significación  $\pm 4$  veces la desviación estándar de los puntos del experimento. Un valor para determinado clon que lo supere se traducirá en la presencia de un cambio en el número de copia (deleción o duplicación) en esa posición.

Protocolo de array CGH

Fecha:

Muestra	ng/ $\mu$ l	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	Observaciones

Diseño experimento:

N° tubo	Muestra	Marcaje	ng/ $\mu$ l	Pureza (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	150 ng ( $\mu$ l)	H <sub>2</sub> O hasta 10,5 $\mu$ l	Random Primer ( $\mu$ l)
							10
							10
							10
							10
							10
							10

**Día 1: Marcaje**

- 1) Vórtex suave
- 2) Pulso
- 3) Incubar en baño a 98°C durante 15'
- 4) Parar desnaturalización en hielo (5')
- 5) Pulso 1', dejar en hielo
- 6) Añadir 2,5  $\mu$ l dNTPs ("dCTP")
- 7) Añadir 1,5  $\mu$ l dCTP-Cy5 o Cy3
- 8) Vórtex
- 9) Pulso
- 10) Añadir 0,6  $\mu$ l fragmento Exoklenow
- 11) Vórtex corto y suave
- 12) Pulso
- 13) Incubar 16 h a 37°C en oscuridad

**Día 2: Purificación de la sonda e hibridación**

- 1) Pulso
- 2) Añadir 2,5  $\mu$ l de Stop Buffer
- 3) Añadir 75  $\mu$ l de TE (10 mM Tris / HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0)
- 4) Añadir 400  $\mu$ l de Buffer A
- 5) Vórtex
- 6) Traspasar a columnita
- 7) Pulso 1' a 13.000 rpm
- 8) Añadir 600  $\mu$ l de Buffer B
- 9) Centrifugar 1' a 13.000 rpm
- 10) Añadir 200  $\mu$ l de Buffer B
- 11) Centrifugar 1' a 13.000 rpm
- 12) Poner nuevo eppendorf en la columna
- 13) Añadir 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O
- 14) Esperar 1'
- 15) Centrifugar 1' a 13.000 rpm
- 16) Medir el marcaje en el espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, v 3.1)) y conservar a 4°C en oscuridad hasta su uso.

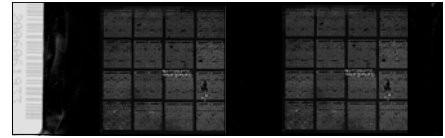


Cuantificación de la reacción de marcaje							
N° tubo	Muestra	Marcaje	ng/μl (DNA)	pmol/μl (sonda)	Pureza (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	Actividad específica (ng/pmol x 3,08)	1050 ng (Cy5 30%) 2450 ng (Cy3 70%)

Elaboración de la sonda							
Sondas combinadas		Mix A	Mix B	Mix C	Blocking Solution		
Cy5	N° tubo				Esperma de salmón (10 mg/ml) (μl)	10	
	Muestra						
	1050 ng (μl)						
Cy3	N° tubo						
	Muestra						
	2450 ng (μl)						
Cot-1 DNA	100 μg (= 100 μl)	50	50	50	1 μg/ml (μl)		16,6
NaAc (3M)	0,1 x volumen total (μl)				0,1 x volumen total (μl)		2,7
EtOH (100%)	2,5 x volumen total (μl)				2,5 x volumen total (μl)		73,3

- 17) Preparar los mixes y las Blocking Solutions (BS)
- 18) Vórtex. Poner papel de aluminio en los mixes
- 19) 30' a -70°C (o a -20°C overnight)
- 20) Centrifugar 15' a 13.000 rpm a 4°C
- 21) (Poner el Hybmix a 75°C) ⇒ ⇒ 10% Dextran sulfato; 50% Formamida; 10 mM Tris HCl; 2X SSC / 0,1% Tween 20; pH 7,5
- 22) Eliminar el etanol
- 23) Pulso
- 24) Eliminar el resto de sobrenadante con cuidado
- 25) Dejar los tubos secarse durante 5'
- 26) Añadir 20 μl de Hybmix a la BS
- 27) Añadir 15 μl de Hybmix + 2 μl de tRNA al probe-mix
- 28) Resuspender mediante vórtex (largo)
- 29) Incubar todos los tubos a 37°C durante 10' (vórtex entre medias)
- 30) Vórtex
- 31) Poner todos los tubos durante 10' a 75°C (vórtex entre medias)
- 32) Pasar directamente a hielo y mantener 5' (vórtex entre medias)
- 33) Vórtex y pulso (preparar una cámara húmeda y precalentar a 37°C)
- 34) Incubar los Probe-mixes durante 1 h a 37°C
- 35) Poner el slide en incubador a 37°C
- 36) Dejar secar cubres (24 x 24 mm) lavados con etanol
- 37) Echar la Blocking Solution en el slide
- 38) Poner rápidamente el cubreobjetos
- 39) Introducir el slide en la cámara húmeda precalentada durante 1 h a 37°C
- 40) Preparar una solución al 20% de formamida, echar en cámara de hibridación y precalentar ⇒ ⇒ 3ml F + 1,5ml 20xSSC + 10,5 ml H<sub>2</sub>O (V<sub>f</sub>=15 ml)
- 41) Sacar los probe-mixes del incubador
- 42) Pulso
- 43) Poner los probe-mixes a 37°C hasta echarlos en el slide
- 44) Retirar los cubres del slide
- 45) Poner el slide en el incubador a 37°C
- 46) Echar los probe-mixes en el slide (evitar exposición a la luz!!)
- 47) Poner cubre asegurando que el array queda completamente cubierto, eliminando las burbujas que aparezcan entre éste y el cubre y presionando las esquinas para asegurar una hibridación homogénea
- 48) Incubar durante 48-72 h a 37°C

Fecha	Nº de slide	Mix
	Up	
	Down	
	Up	
	Down	



### Día 3: Lavado

- 1) Lavar coplin de porcelana (opaco) con agua destilada. Poner 1X PBS / 0,05% Tween 20 (Jar A)
- 2) Preparar dos coplin más:
 

⇒ 100 ml 10X PBS + 900 ml H<sub>2</sub>O + 500 µl Tween 20; pH 7,0 (V<sub>f</sub> = 1 l)
- 1X PBS / 0,05% Tween 20 (Jar B) ⇒
- Solución de Formamida / 2X SSC (Poner a 42°C) ⇒
 

⇒ 200 ml Formamida ultra pura + 160 ml H<sub>2</sub>O + 40 ml 20X SSC; pH 7,0 (V<sub>f</sub> = 400)
- 3) Introducir el slide en Jar A durante 2-3' en agitación
- 4) Retirar los cubres
- 5) Introducir el slide en Jar B durante 10' en agitación
- 6) Pasar el slide a la solución de formamida a 42°C e incubar durante 30'
- 7) Añadir nuevo 1X PBS / 0,05% Tween 20 en Jar B
- 8) Incubar el slide en Jar B durante 10' en agitación
- 9) Centrifugar el slide 1' a 1.200 rpm y conservar en oscuridad y a 4°C hasta su escaneado (GenePix 4000B Microarray Scanner Pro 6.0, Axon Instruments Inc.).

Nota: los reactivos y productos específicos necesarios para llevar a cabo el protocolo se detallan a continuación:

- 1Mb array CGH-Sanger 3K slides (VIB MicroArray Facility, [www.microarrays.be](http://www.microarrays.be))
- BioPrime Array CGH Genomic Labeling System (incluye módulos de marcaje y purificación para 30 reacciones) (Invitrogen, c.n. 18095-011)
- Human Cot-1 DNA (1 mg) (Invitrogen, c.n. 15279-101)
- Yeast tRNA (50 mg) (Invitrogen, c.n. 15401-029)
- Cy3-dCTP (25 nmol) (Amersham Biosciences, c.n. PA53021)
- Cy5-dCTP (25 nmol) (Amersham Biosciences, c.n. PA55021)
- Salmon Sperm DNA (5 x 1 ml, 10 mg/ml) (Invitrogen, c.n. 15632-011)

### 3.4 - Distribución temporal del trabajo

La distribución temporal del trabajo experimental realizado se representa esquemáticamente a continuación (figura 18):

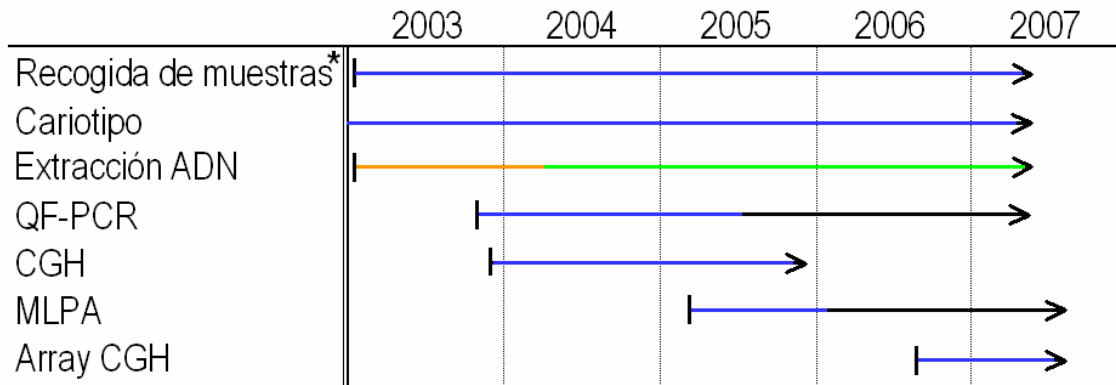


Figura 18. Distribución temporal del trabajo realizado para la elaboración del presente documento. En azul se refleja el periodo de tiempo aproximado empleado para la validación de cada una de las técnicas, y cuyos resultados son aquí presentados. La extracción de ADN se realizó con el kit de columnas de QIAGEN (naranja) hasta marzo de 2004; a partir de entonces (verde), todas las muestras procesadas fueron extraídas con el BioRobot EZ1.

Nota: sería injusto y poco acertado no señalar la aportación activa así como la colaboración de distintas personas en el trabajo experimental específico que subyace a la presente memoria, a saber:

- Dra. Maria José Trujillo Tiebas en el diseño y puesta a punto de las PCR multiplex A y B para el estudio prenatal de aneuploidías en muestras de líquido amniótico.
- Ana Bustamante Aragonés en la importación desde Leuven (Bélgica) y puesta a punto del protocolo de array CGH.
- Dras. Carmen Ramos Corrales e Isabel Lorda Sánchez en el cariotipado de las muestras.
- Rocío de Libertad Cardero Merlo y Fernando Infantes Barbero en el procesamiento de los cultivos celulares.
- Víctor Martínez González en la puesta a punto del protocolo de CGH.
- Dra. Marta Rodríguez de Alba Freiría en la confirmación de los hallazgos moleculares mediante FISH en aquellos casos indicados.

## 4 – RESULTADOS

## 4.1 - QF-PCR

## 4.1.1 - Detección de alteraciones cromosómicas numéricas: ensayo de validación

De entre los 94 abortos cariotipados, 27 resultaron varones normales (46,XY), 32 hembras normales (46,XX) y 35 de ellos portadores de anomalías numéricas (tabla V).

La calidad del ADN de 5 muestras de abortos cariotipados no permitió su amplificación mediante PCR. Los resultados moleculares concordaron con los obtenidos citogenéticamente en 81 de los 89 casos restantes; de 5 casos cariotipados como 46,XX y posteriormente confirmados como contaminación materna, los 5 resultaron ser varones, 2 de ellos con trisomía 13. Por otra parte, 3 casos con cariotipo anómalo (47,XY,+9; 47,XY,+10; 69,XXX), resultaron como hembras normales (disómicas) para todos los marcadores cromosómicos empleados, sugiriendo la posible confusión del tejido analizado molecularmente como fetal por materno.

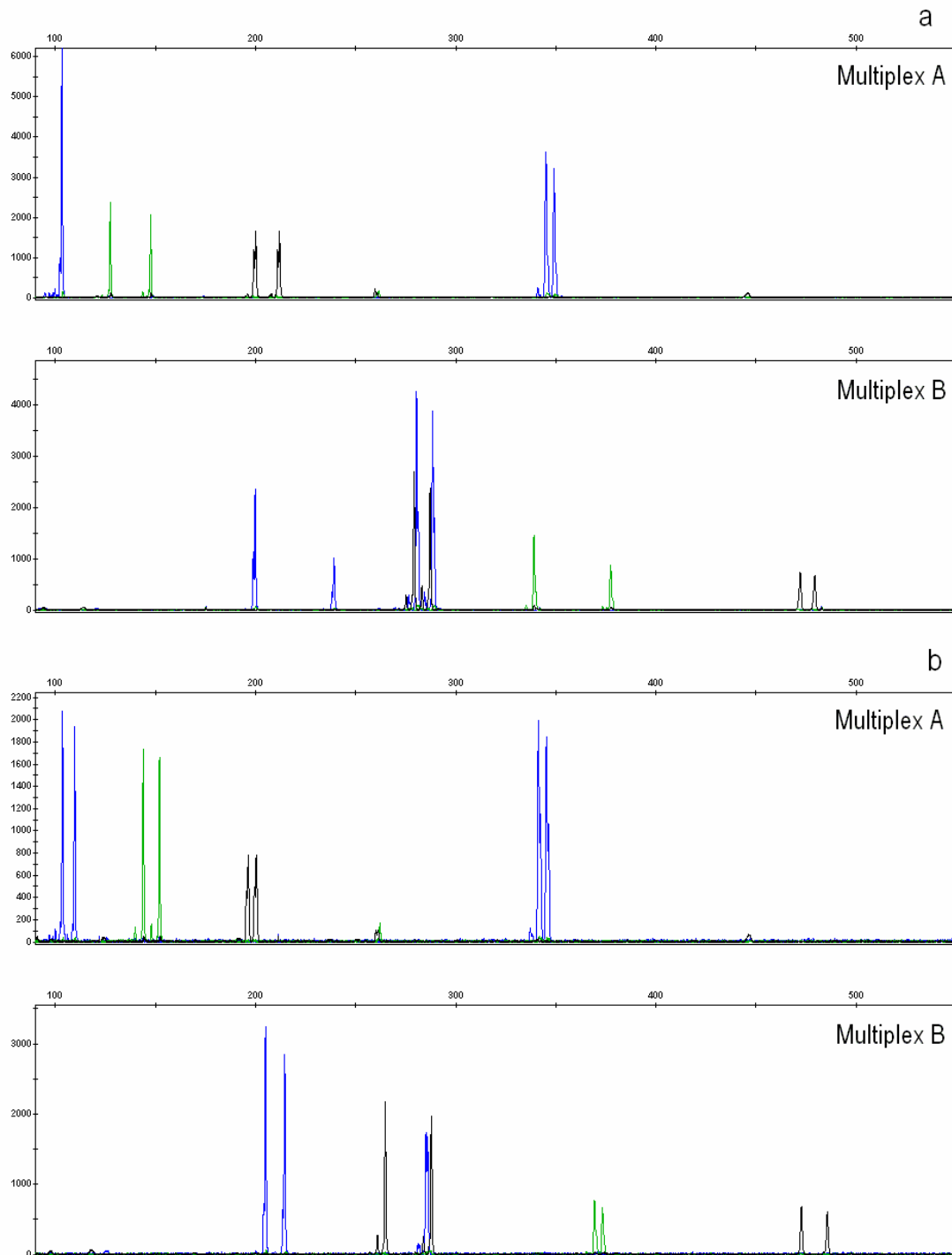
En 62 de los 66 casos (94%) en los que no se disponía de cariotipo por fracaso o contaminación del cultivo (54) o bien porque éste no llegó a establecerse (12) se obtuvieron resultados moleculares detectando contaminación materna en 2 de las muestras y 24 de ellas con dotación cromosómica alterada (tabla VI).

Cariotipo	Nº de casos	Alteración cromosómica	Nº de casos
Euploide		Trisomía 2	1
46,XX	32	Trisomía 7	1
46,XY	27	Trisomía 13	6
Aneuploide		Trisomía 15	1
45,X	7	Trisomía 18	2
47,XX,+7	1	Trisomía 21	3
47,XX,+13	2	Trisomía 22	3
47,XX,+16	1	Doble trisomía (+X,+18)	1
47,XX,+18	3	Monosomía X	3
47,XX,+21	1	Triploidía	3
47,XX,+22	3	Total	24
47,XY,+9	1		
47,XY,+10	1		
47,XY,+13	2		
47,XY,+15	1		
47,XY,+16	1		
47,XY,+18	2		
47,XY,+21	2		
48,XX,+8,+21	1		
48,XX,+15,+22	1		
Poliploide			
69,XXX	3		
69,XXY	2		
Total	94		

Tabla VI. Abortos sin cariotipo y con dotación cromosómica desequilibrada detectada mediante QF-PCR.

Tabla V. Abortos cariotipados estudiados mediante QF-PCR.

En las siguientes figuras (19-25) se muestran los resultados obtenidos mediante QF-PCR en algunas de las muestras incluidas en el ensayo de validación:



**Figura 19.** Electroferogramas mostrando resultados de QF-PCR (multiplex A y B) para (a) una muestra control de hembra normal (46,XX) y (b) una muestra control de varón normal (46,XY). El patrón de amplificado obtenido para todos los marcadores autosómicos es informativo y disómico dialélico según lo esperado. En cuanto a los marcadores específicos de los cromosomas sexuales, la amelogenina (AMXY) presenta un único pico de amplificado de 106 pb en *a* y dos picos (de 106 y 112 pb) en *b*, correspondiendo el de mayor tamaño al específico del cromosoma Y. Por su parte, el pentanucleótido X22 (no indicado por tanto para valorar efecto de dosis) presente en la región pseudoautosómica de los cromosomas sexuales presenta un patrón dialélico en ambas muestras y sin embargo, XHPRT (presente sólo en el cromosoma X) muestra un patrón disómico dialélico en *a* y monoalélico (no informativo, se asume monosómico) en *b*.

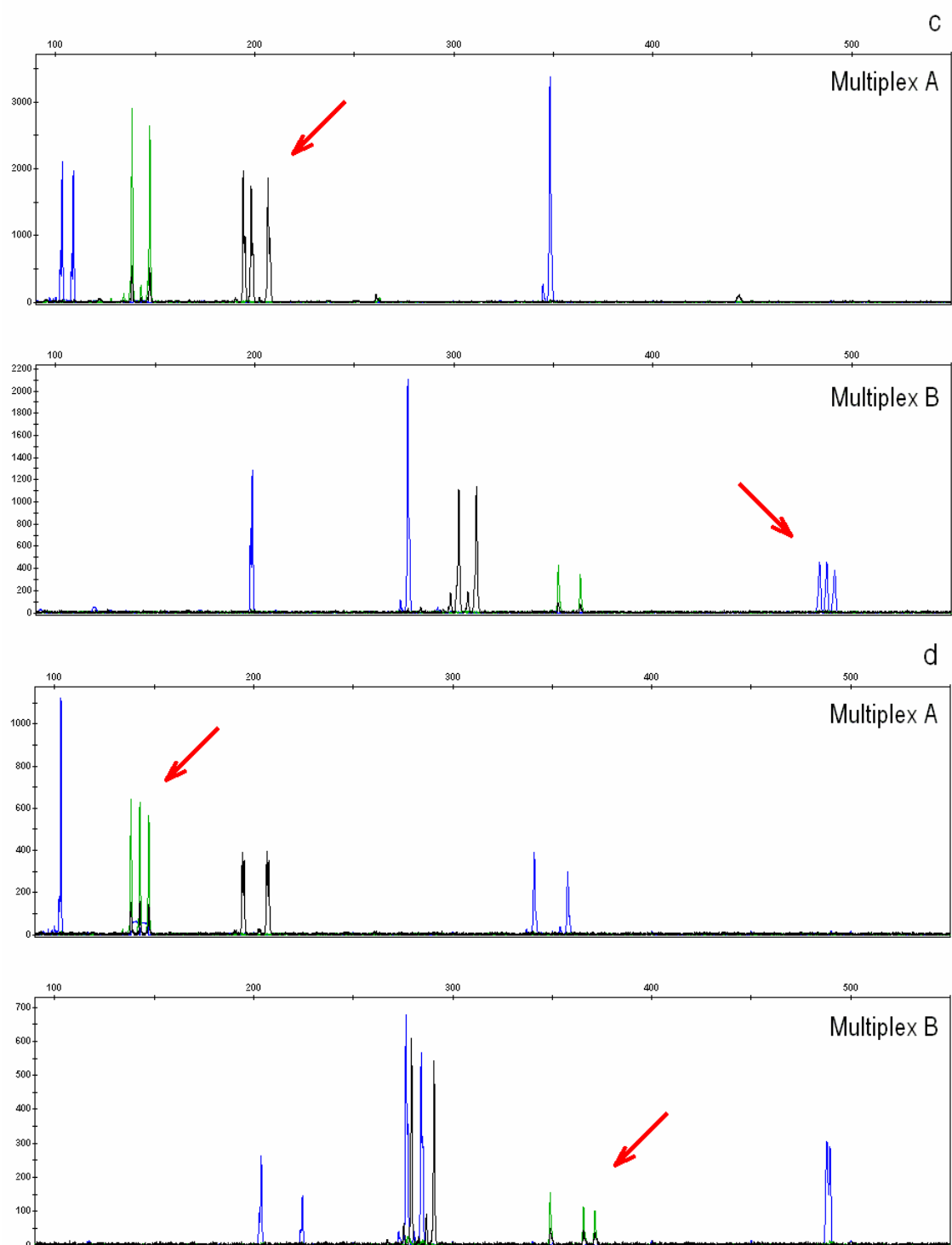


Figura 20. Multiplex A y B en (c) un aborto de sexo masculino con trisomía 13 (patrón trisómico trialélico para D13S631 y D13S634, *flechas*) y (d) un aborto de sexo femenino con trisomía 18 (patrón trisómico trialélico para D18S635 y D18S386, *flechas*).

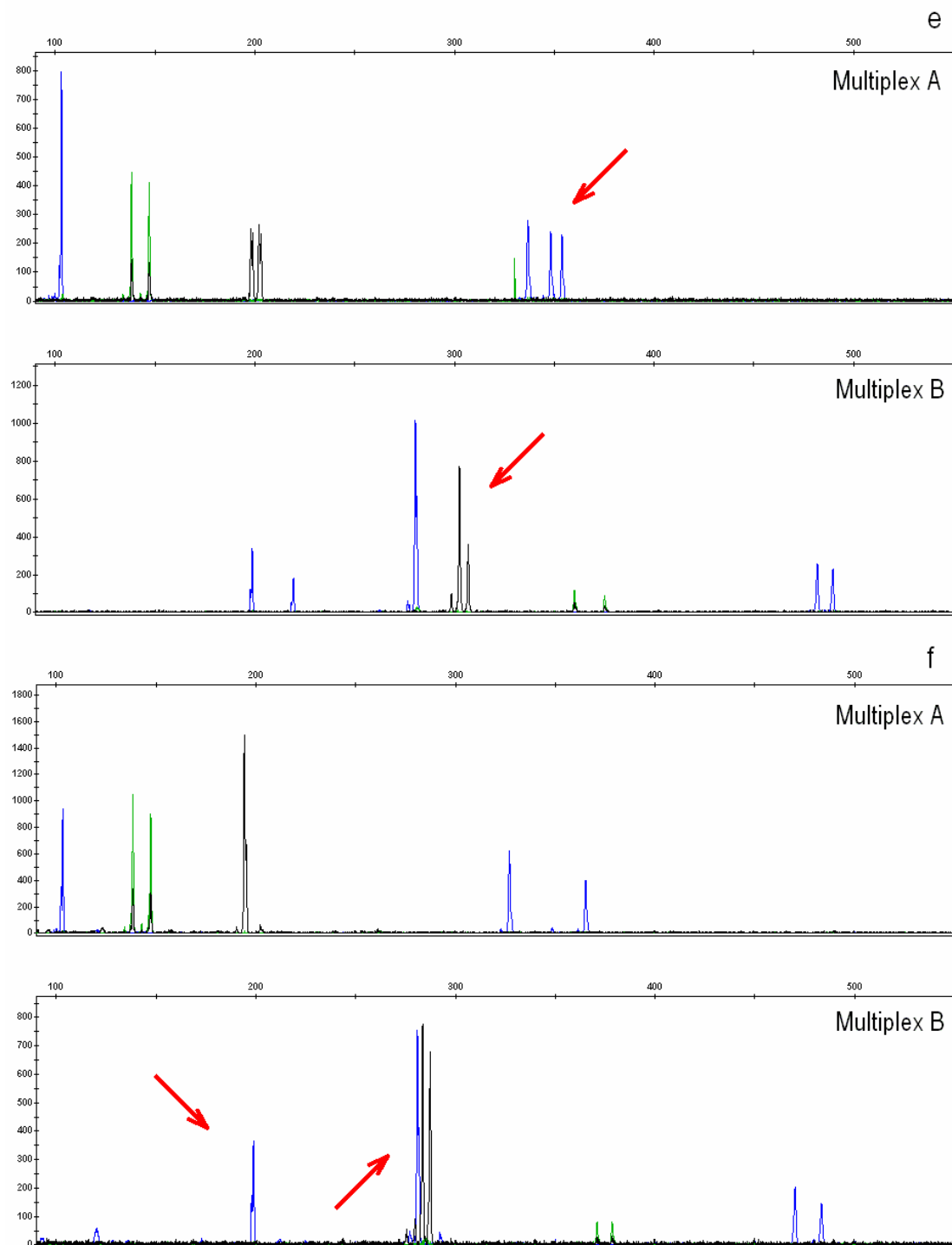


Figura 21. Multiplex A y B en (e) un aborto de sexo femenino con trisomía 21 (patrón trisómico trialélico para D21S1414 y trisómico dialélico para D21S1411, *flechas*) y resultados compatibles con monosomía X en otro aborto (f), mostrando el producto de amplificado de 106 pb para AMXY y un patrón monoalélico (no informativo) para X22 y XHPRT (*flechas*).



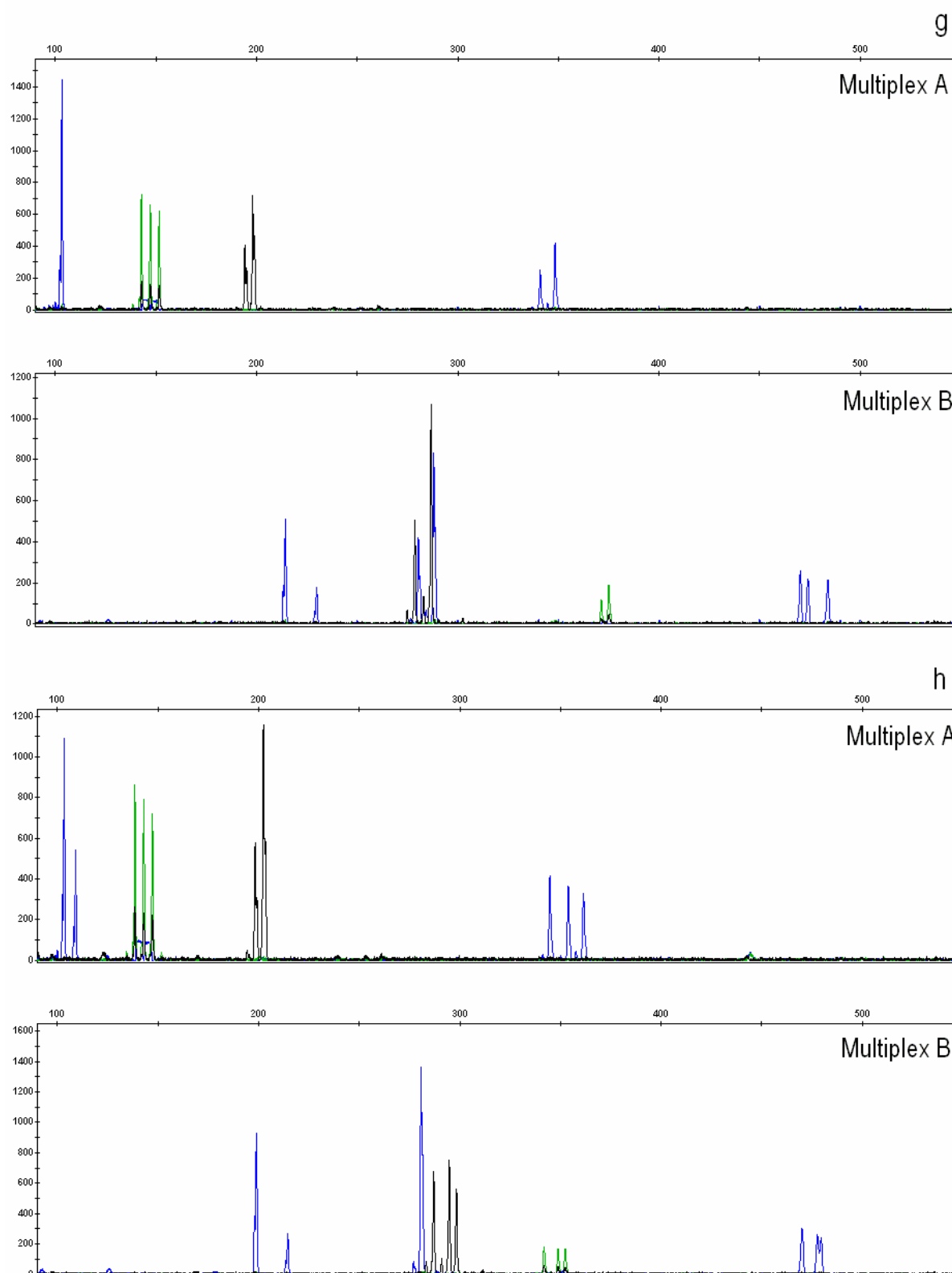


Figura 22. Multiplex A y B en (g) aborto triploide (patrón trisómico para todos los marcadores autosómicos amplificados), asumiéndose la fórmula cromosómica como 69,XXX debido a la ausencia de amplificado del fragmento de 112 pb de AMXY y al patrón trisómico dialélico de XHPRT. La triploidía de tipo 69,XXY se puede asumir en h al observar (además de un patrón trisómico para todos los marcadores autosómicos amplificados) la presencia del fragmento de amplificado de AMXY correspondiente al cromosoma X con efecto de dosis frente al correspondiente al cromosoma Y.

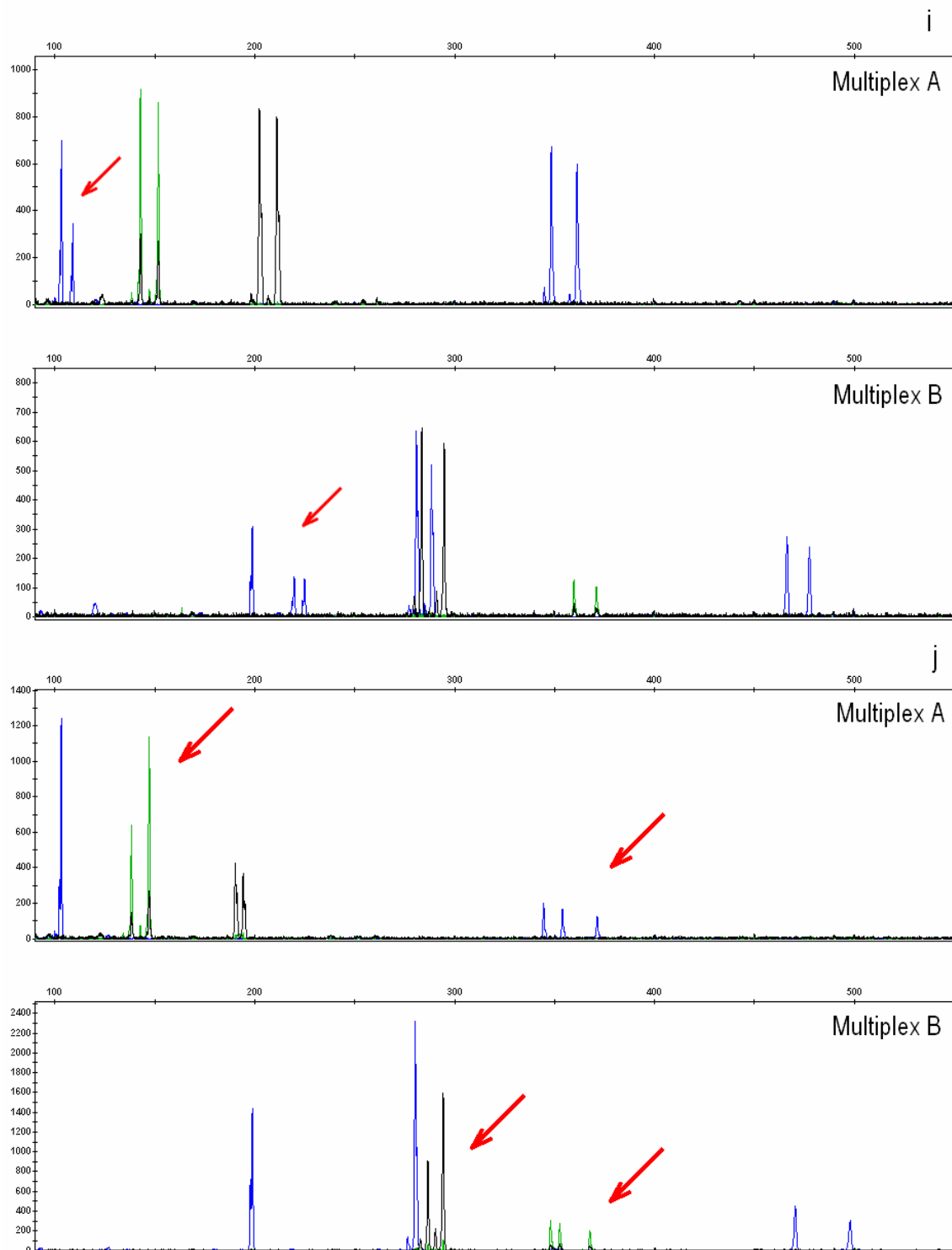


Figura 23. Multiplex A y B en (i) aborto con un patrón disómico dialélico para XHPRT y todos los marcadores autosómicos y un patrón trisómico para AMXY y X22 (*flechas*), pudiendo el resultado corresponder por tanto al de un espécimen 47,XXY (no se descarta la presencia de alteraciones en otros cromosomas no estudiados en esta muestra). Por su parte, el gráfico j muestra una doble trisomía 18 y 21 (*flechas*) a la par que un patrón no informativo para los cromosomas sexuales.

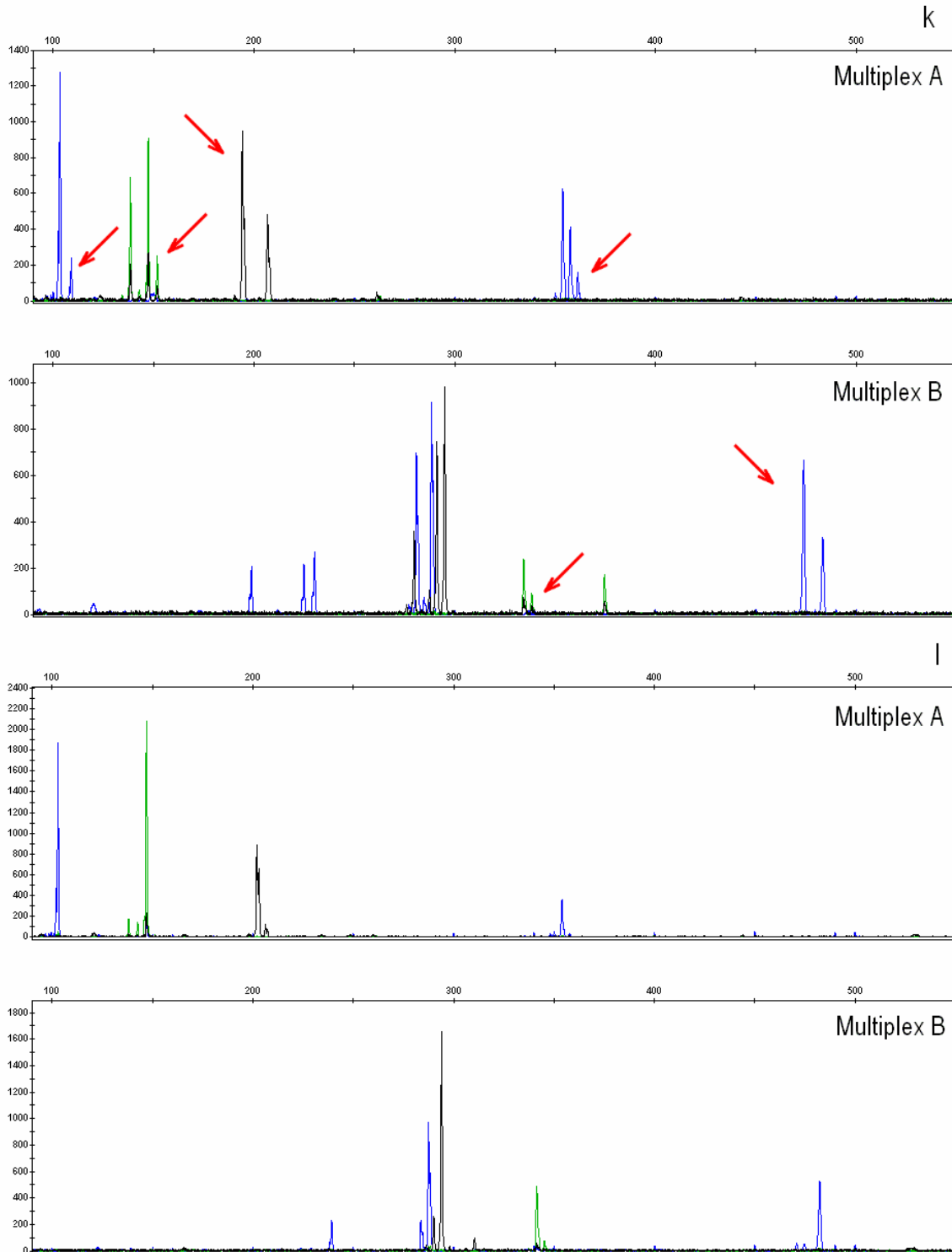


Figura 24. Multiplex A y B en (k) una muestra de ADN en la que se evidencia la presencia de contaminación materna (en mayor proporción ésta que la correspondiente al tejido de origen fetal) al aparecer para la mayoría de los marcadores un “tercer alelo” (alelo fetal de origen paterno, *flechas*) siempre en menor proporción relativa. Además, la presencia de ADN de un feto de sexo masculino se evidencia en este caso por la amplificación del fragmento de 112 pb en AMXY correspondiente al cromosoma Y. Al aparecer el área del “tercer alelo” en algunos marcadores sumada a uno de los que presenta mayor intensidad de fluorescencia (alelo fetal de origen materno), se descarta la posible contaminación con ADN exógena y se asume que ésta pueda ser debida a la incorrecta separación de ambos tejidos, materno y fetal, en el momento del procesamiento y selección de la muestra a estudiar. En el gráfico / se muestra un patrón de amplificado monoalélico (no informativo) para todos los marcadores y ausencia del cromosoma Y, compatible con el diagnóstico de mola completa homocigota (ver apartado 3.1.3 del presente trabajo).

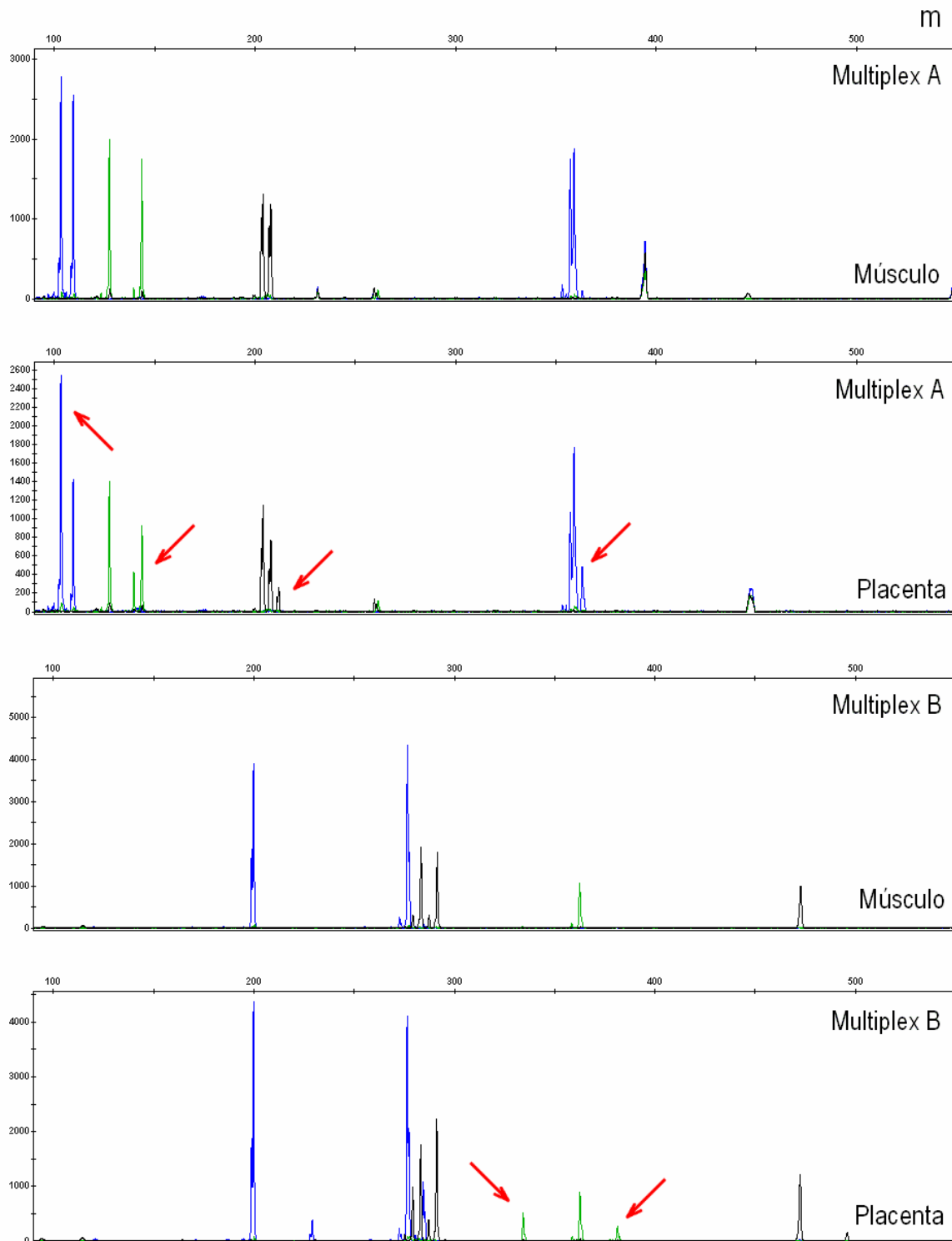


Figura 25. Multiplex A y B en (*m*) muestras de ADN del aborto AB-525 obtenidas a partir de músculo y placenta. El patrón de amplificado de la muestra de ADN obtenido a partir de placenta revela la presencia de contaminación con ADN materno. Analizando el marcador D18S386 se observa que el feto (muestra de ADN a partir de músculo) carece de los dos alelos maternos presentes en la muestra obtenida a partir de tejido placentario (*flechas*). Para el marcador D16S535, el feto presenta una contribución disómica normal con un alelo heredado de cada progenitor. Debido a que el marcador D18S386 se localiza en 18q22.1, se sospecha la posible delección terminal del brazo largo del cromosoma 18 en este feto (ver Diego-Alvarez D. *et al.* 2005b, anexo I).

#### 4.1.2 - Detección de mosaicismos cromosómicos

##### 4.1.2.1 - Ensayo de sensibilidad en la detección de mosaicismos

Los resultados del ensayo diseñado para valorar la sensibilidad de la técnica de QF-PCR en la detección de aneuploidías en bajo grado de mosaicismo (figura 26) confirman la capacidad de ésta para detectar la presencia de ADN exógeno (siempre y cuando el tamaño de los alelos amplificados de nuestra muestra difiera del de aquellos del ADN exógeno) en una proporción igual o superior al 1%. Valores semejantes de contaminación de nuestra muestra con distinto ADN serían detectados, lo que es directamente aplicable a la detección de contaminación materna en nuestras muestras de restos abortivos o a la de trisomías de origen meiótico en mosaico en el caso de que los marcadores empleados resulten informativos (presencia de tres alelos diferenciables en tamaño).

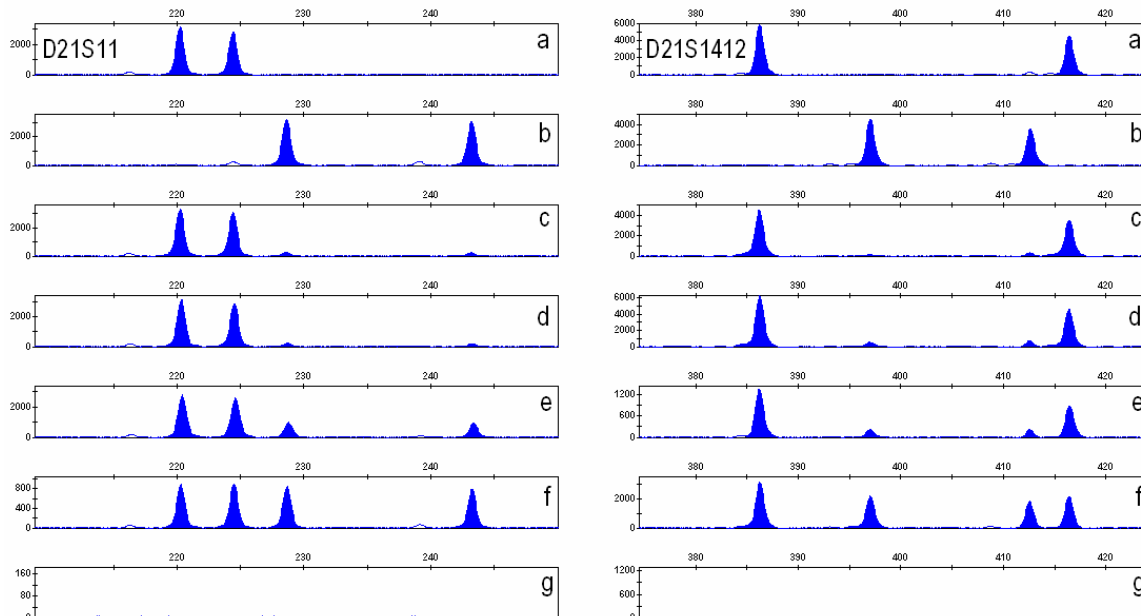


Figura 26. Pruebas de detección de mosaicismo cromosómico con los marcadores STR D21S11 (*izquierda*) y D21S1412 (*derecha*) con dos muestras de ADN mezcladas en distintas proporciones. Ensayo D21S11: (a) DDA, alelos de 219 y 223 pb; (b) EVG, alelos de 227 y 243 pb. Ensayo D21S1412: (a) DDA, alelos de 386 y 418 pb; (b) RGD, alelos de 398 y 414 pb. Las diluciones con respecto de b en ambos ensayos se detallan a continuación: 1% (c), 5% (d), 25% (e), 50% (f), siendo g el control de agua.

## 4.1.2.2 – Resolución de un caso clínico

Los resultados moleculares en el caso AB-509 (figura 27) confirmaron la presencia de la trisomía 9 como un tercer alelo en todas las muestras de ADN del feto estudiadas. El patrón de amplificado sugiere la presencia de la línea celular trisómica en mosaico dentro de cada uno de los distintos tejidos (piel, riñón, hígado y músculo). Además, el origen materno y meiótico puede ser inferido observando el patrón de amplificado de D9S1845 y D9S1862, sugiriendo que se habría producido un rescate de la trisomía en un estadio temprano del embrión, pues la trisomía parece estar representada en similares proporciones en todos los tejidos estudiados).

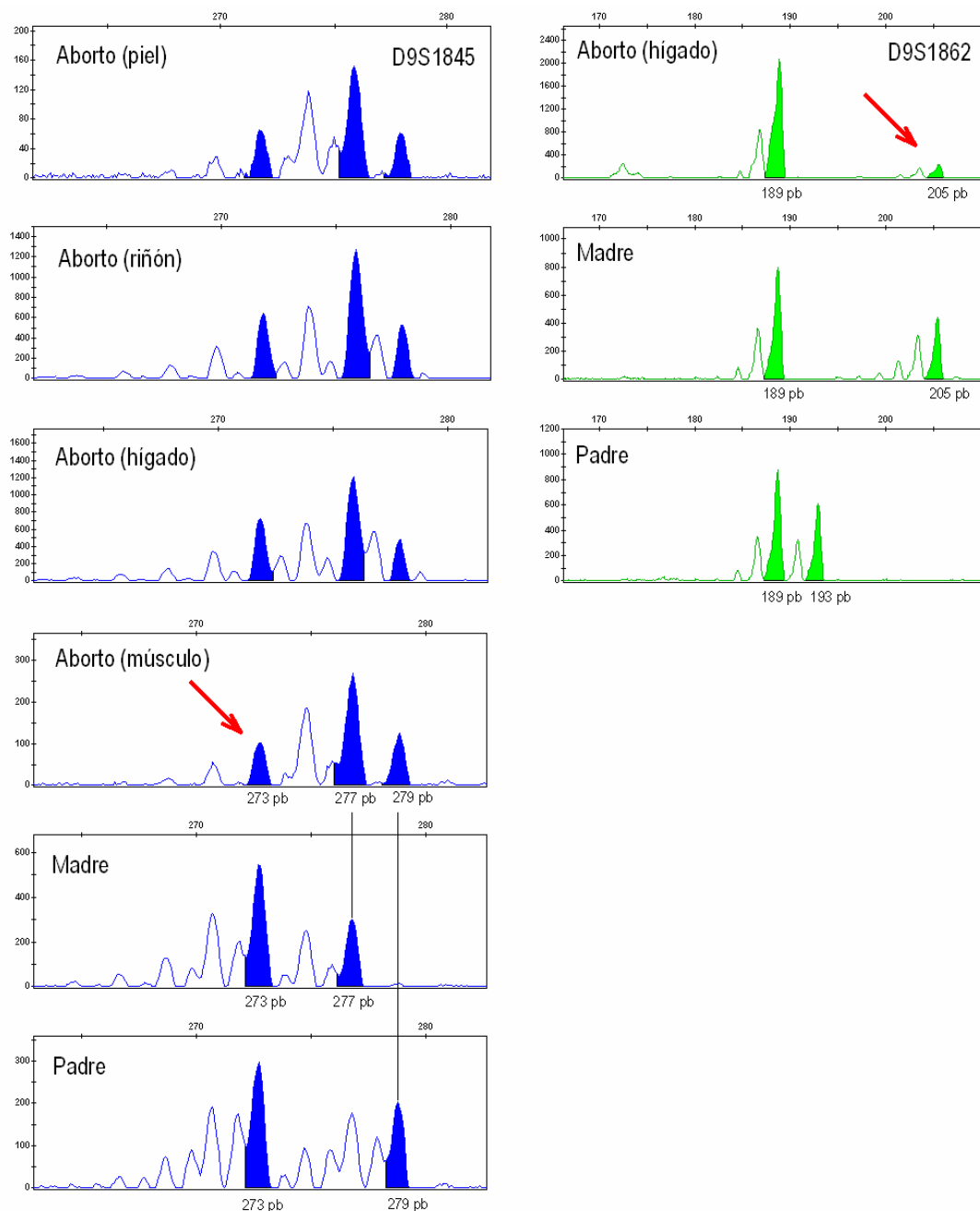


Figura 27. Análisis de marcadores microsatélites (D9S1845 y D9S1862) mediante QF-PCR en muestras de ADN fetal y parentales confirmando la trisomía 9 en mosaico (*flechas*) en todos los tejidos fetales analizados. El análisis conjunto de ambos marcadores permite inferir el origen materno de la trisomía.

#### 4.1.2.3 - Evidencia de mosaicismo cromosómico confinado a la placenta

El estudio citogenético de los restos abortivos en la muestra AB-981 concluyó un cariotipo 46,XX (figura 28). Paralelamente, se llevó a cabo un primer *screening* de aneuploidías mediante QF-PCR en las muestras de ADN procedentes de vellosidades coriales y feto (figura 29). Se obtuvo discordancia entre los resultados de ambas muestras para el marcador D13S634 (el marcador D13S631 no resultó informativo), presentando un patrón trisómico en la muestra de vellosidades pero no en la de ADN extraído a partir de los restos fetales. Seguidamente, y con objeto de confirmar la trisomía 13 en vellosidades, se realizó MLPA con ambos kits de sondas subteloméricas, mostrando los resultados la presencia de trisomía 7 exclusivamente en el mismo tejido además de confirmar la anterior (figura 29). Ambas trisomías pudieron ser confirmadas posteriormente mediante el análisis de microsatélites por QF-PCR, obteniendo un patrón trisómico de amplificado compatible con un mosaicismo de ambas aneuploidías en el mismo tejido. El análisis comparado de los microsatélites (catorce del cromosoma 7 y diecisiete del cromosoma 13, ver tabla VII) del aborto con los de madre es compatible al 100% con un origen materno de ambas trisomías, aunque al no contar con ADN del padre, el origen paterno no se puede descartar. Asimismo, la presencia de un patrón trisómico trialélico para algunos marcadores de ambos cromosomas revela un origen meiótico de la alteración, lo que indicaría por tanto que se habría producido un rescate de ambas trisomías (que darían posteriormente lugar al feto) en aquella línea celular del embrión que posteriormente formaría las estructuras fetales (selección negativa de las células aneuploides en este tejido). Asumiendo el origen materno de ambas trisomías y atendiendo al patrón de reducción o no a homocigosidad de los marcadores pericentroméricos estudiados (tabla VII), podemos situar el origen de la no disyunción en la primera división meiótica para la trisomía 13 y en la segunda división para la trisomía 7. Por último, el trabajo que se quiere realizar es investigar si ambas aneuploidías aparecen en las mismas células (puesto que ambas aparecen en mosaico dentro del mismo tejido) mediante el empleo de FISH sobre núcleos en interfase con sondas de los cromosomas 7, 13 y una adicional como control (para detectar posibles células poliploides) en vellosidades coriales almacenadas a -20°C.

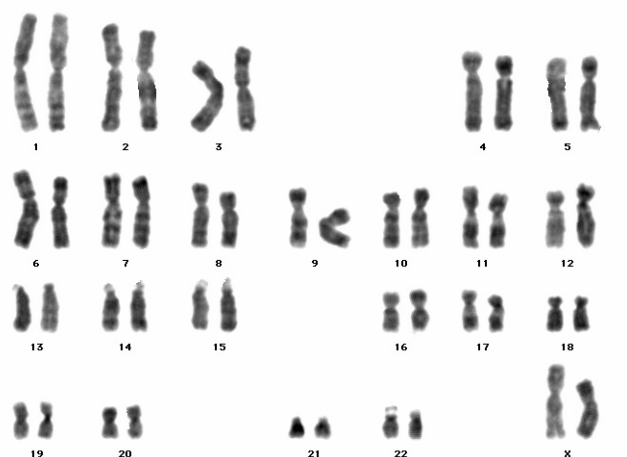


Figura 28. Cariotipo del AB-981.

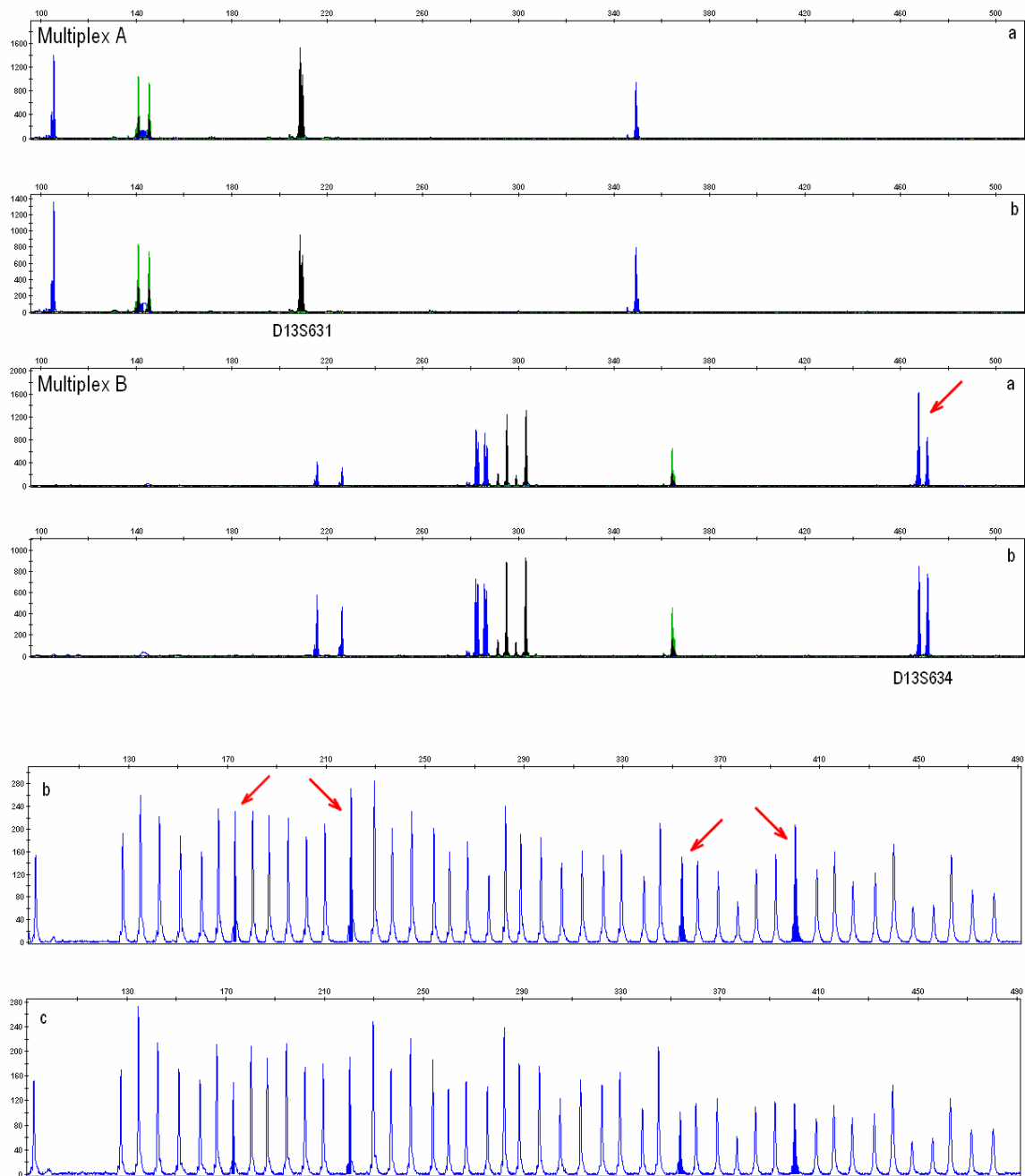


Figura 29. *Superior*, resultados de QF-PCR en muestras de ADN extraídas a partir de (a) vellosidades y (b) feto (AB-981), observándose trisomía 13 en la muestra de vellosidad (patrón trisómico dialélico para D13S634, *flecha*). *Inferior*, MLPA (P036B) en (a) paciente con delección 13q y el mismo aborto (b, vellosidades; c, feto), confirmando además de la alteración anterior la presencia de trisomía 7 en el mismo tejido (*flechas*). Los picos sombreados corresponden a las sondas CENTA1 (7p), PSPC1 (13p), VIPR2 (7q) y F7 (13q).



Marcador	Localización cromosómica	Patrón de amplificado	Reducción homocigosidad	Marcador	Localización cromosómica	Patrón de amplificado	Reducción homocigosidad
D7S531	7p22.3	1:1:1	ND	D13S175	13q12.11	NI	ND
D7S507	7p21.1	2:1	ND	D13S217	13q12.12?	1:1:1	NR
D7S493	7p15.3	2:1	ND	D13S171	13q12.2	2:1	NR
D7S516	7p15.1	2:1	ND	D13S218	13q13.1	2:1	NR
D7S484	7p14.1	NI	ND	D13S263	13q13.2	1:1:1	NR
D7S510	7p14.1	2:1	R	D13S153	13q14.11	1:1:1	NR
D7S519	7p12.3	2:1	R	D13S634	13q21.2	2:1	ND
D7S502	7q11.21	2:1	ND	D13S156	13q21.32	2:1	NR
D7S669	7q11.23	2:1	ND	D13S170	13q22.1	2:1	NR
D7S630	7q21.13	2:1	ND	D13S317	13q22.2	2:1	ND
D7S657	7q21.3	2:1	ND	D13S265	13q31.1	2:1	ND
D7S515	7q22.1	1:1:1	ND	D13S631	13q32.1	NI	ND
D7S636	7q36.1	1:1:1	ND	D13S159	13q32.2	1:1:1	NR
D7S798	7q36.2	2:1	ND	D13S158	13q33.1	2:1	ND
				D13S173	13q33.2	1:1:1	NR
				D13S1265	13q33.3	2:1	NR
				D13S285	13q34	2:1	ND

Tabla VII. Establecimiento del origen meiótico de las trisomías 7 y 13 comparando el patrón de amplificado de los marcadores empleados obtenido en el AB-981 con respecto de los de la paciente, basándose en la reducción (*R*) o no (*NR*) a homocigosidad de éstos y su localización cromosómica. *NI*: no informativo; *ND*: no determinable, bien por su carencia de informatividad (patrón monoalélico en el aborto y/o en la madre) y/o por desconocimiento del tamaño de los alelos maternos. Nota: observar la localización cromosómica de los marcadores empleados en el anexo IV de la presente memoria.

#### 4.1.3 - Diagnóstico de molas hidatidiformes

De entre las 475 muestras, 3 fueron diagnosticadas como molas homocigotas completas (AB-608, AB-810 y AB-962) (figura 30) y 2 como molas parciales (AB-604 y AB-758) (figura 31). Dos de las diagnosticadas molecularmente como completas fueron erróneamente clasificadas como parciales en base a criterios morfológicos.

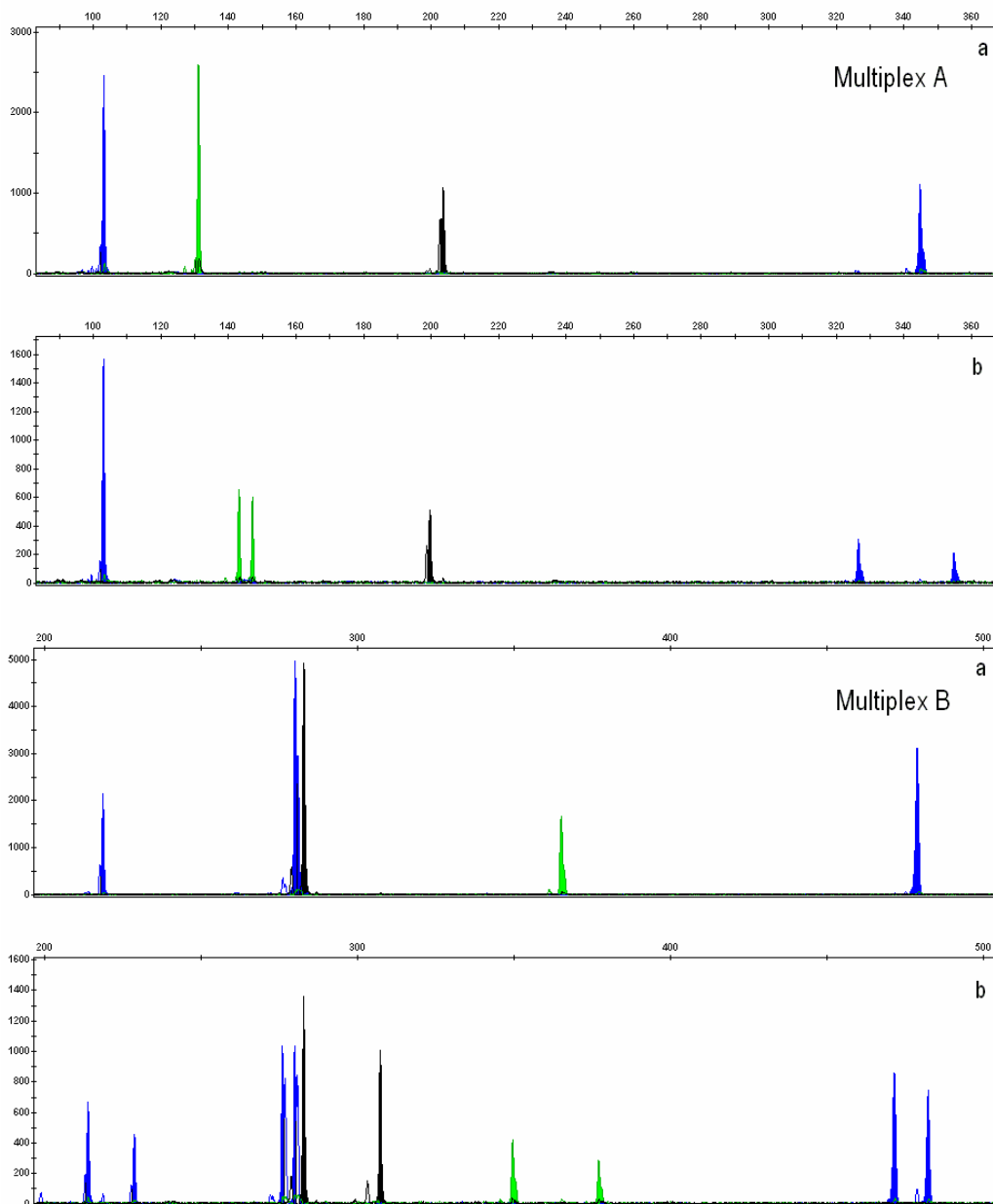


Figura 30. Multiplex QF-PCR (A y B) en (A) muestra de ADN obtenido a partir de vellosidades coriales (AB-608) y (B) ADN materno. Se observa un patrón de amplificado homocigoto (monoalélico) para cada marcador en la muestra de vellosidad. Además, la mayoría de los marcadores presentan incompatibilidad con herencia materna. Los resultados son los esperados para una mola completa homocigota.

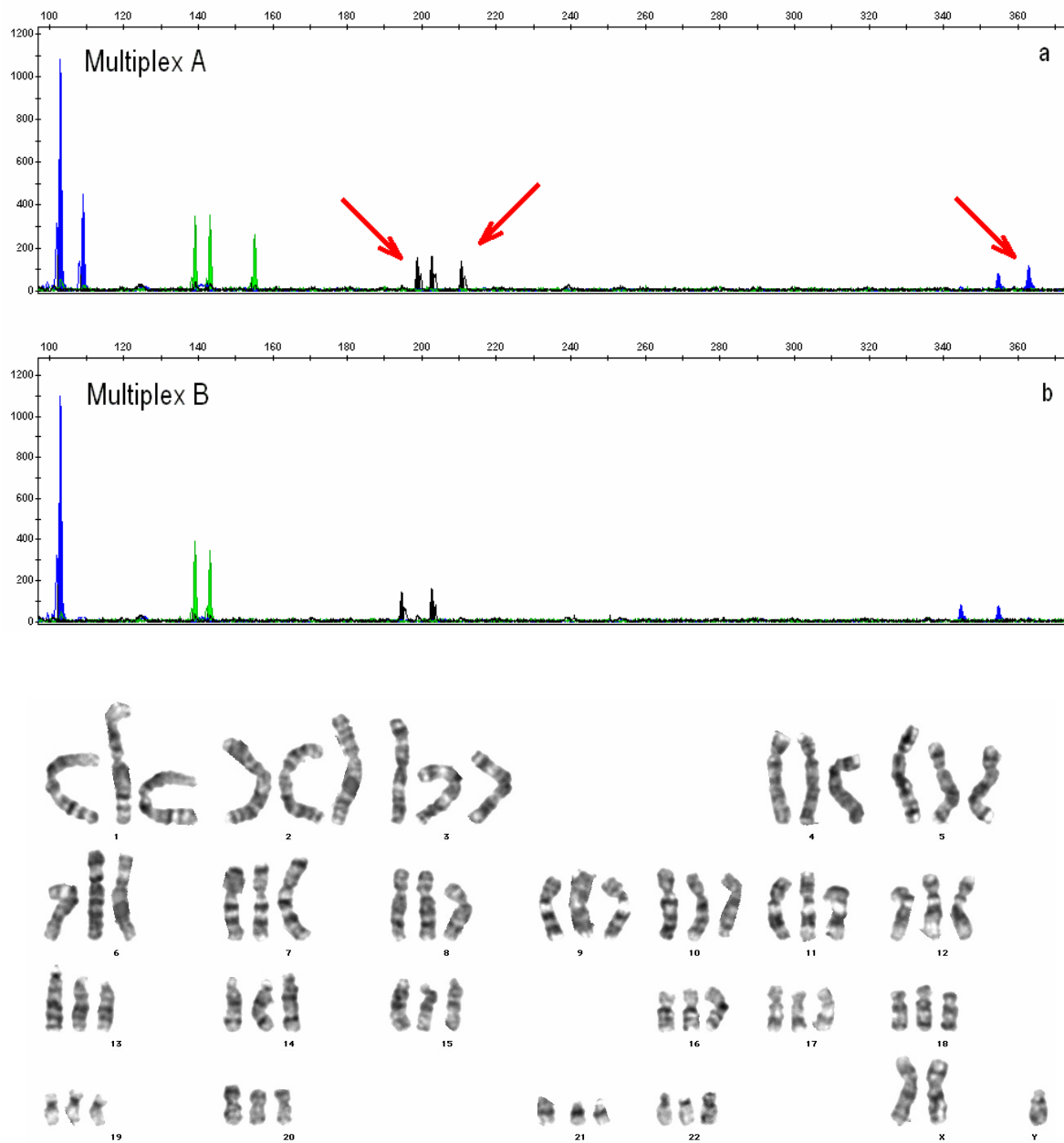


Figura 31. Multiplex QF-PCR (A y B) en (A) ADN obtenido a partir de vellosidades coriales (AB-604) y (B) ADN materno. Se asume triploidía al observar un patrón trisómico (ya sea di- o trialélico) para cada marcador en la muestra de vellosidades. Las flechas indican los alelos de origen paterno en aquellos marcadores informativos. Los resultados citogenéticos y moleculares son compatibles con una mola parcial 69,XXY.

#### 4.1.4 - Determinación del origen parental y meiótico / mitótico de la aneuploidía

El estudio de marcadores microsatélites permitió establecer con certeza el origen parental de la alteración tanto en aquellos casos que presentaron doble trisomía (tabla VIII) como en los abortos trisómicos recurrentes (tabla IX).

En los cuatro casos de doble trisomía, los cromosomas extra presentaron un origen materno, habiéndose producido la no-disyunción que explicaría la doble trisomía en la primera división meiótica en tres de los casos y en ambas (MI y MII respectivamente) en el cuarto.

Caso	Cariotipo	Edad gestacional	Historia reproductiva	Origen parental	No disyunción	Edad materna	Edad paterna
AB-407	48,XX,+15,+22	7	G3/P2/A1	Materno	MI	37	39
AB-487	48,XX,+8,+21	8	G4/P2/A2	Materno	MI	40	49
AB-509	48,XXX,+18	13	G3/P1/A2	Materno	MI	37	43
AB-605	48,XY,+18,+22	8	G4/P2/A2	Materno	MI (22) / MII (18)	43	60

Tabla VIII. Determinación del origen de la doble trisomía.

En dos de los cinco casos de trisomía en abortos consecutivos (parejas B y E), el origen del material cromosómico extra se estableció como paterno en una de las dos trisomías y materno (meiótico) en el siguiente evento. En las restantes tres parejas, el origen de ambas trisomías resultó materno, siendo MI para las trisomías de los cromosomas 7, 13, 16 y 22 y MII para las de los cromosomas 5 y 18. En la totalidad de los casos se observó heterotrisomía (trisomía de un par cromosómico distinto de la anterior), descartándose por tanto la presencia de un mosaicismo cromosómico gonadal en alguno de los progenitores como causa de la aneuploidía fetal.

Caso 1°	Cariotipo	Origen material cromosómico extra	Edad materna	Edad paterna	Caso 2°	Cariotipo	Origen material cromosómico extra	Historia reproductiva	Edad materna	Edad paterna
Pareja A	BC-2601 47,XX,+22	Materno, MI	32	32	BC-2733	47,XX,+7	Materno, MI	G3/P1/A2	33	33
Pareja B	AB-529 47,XX,+21	Paterno, MII/PZ	33	39	AB-707	47,XX,+22	Materno, MI	G2/P0/A2	34	40
Pareja C	AB-576 47,XX,+13	Materno, MI	33	34	AB-736	47,XX,+5	Materno, MII	G4/P0/A4	33	35
Pareja D	AB-534 47,XX,+16	Materno, MI	39	40	AB-697	47,XY,+7	Materno, MI	G6/P1/A5	40	41
Pareja E	AB-579 47,XY,+7	Paterno, MII/PZ	30	N.D.	AB-757	47,XX,+18	Materno, MII	G2/P0/A2	31	N.D.

Tabla IX. Determinación del origen de la aneuploidía en abortos trisómicos recurrentes.

## 4.2 - CGH

El resultado obtenido mediante CGH en los 6 casos que disponían de cariotipo como control fue el esperado (tabla X). Asimismo, se determinó un resultado en 44 de las 46 muestras estudiadas en las que no se disponía de cariotipo o éste fue obtenido posterior al estudio molecular. Veintiséis de estos casos resultaron normales (no hallándose pérdidas o ganancias de material cromosómico), 15 aneuploides (ver ejemplo en figura 32) y dos con deleciones terminales (tabla XI). En las restantes 2 muestras, no se pudo establecer resultado alguno.

Nº caso	Cariotipo	Resultado CGH
AB-377	45,X	Monosomía X
AB-440	47,XX,+18	XX, trisomía 18
AB-465	47,XX,+21	XX, trisomía 21
AB-491	47,XY,+13	XY, trisomía 13
AB-492	47,XX,+21	XX, trisomía 21
AB-519	47,XX,+7	XX, trisomía 7

Tabla X. Casos con cariotipo previo estudiados mediante CGH.

Nº caso	Fórmula sexual	Resultado	Nº caso	Fórmula sexual	Resultado
AB-138	XX	Normal	AB-484	XX	Normal
AB-148	XX	Normal	AB-489	XX	Normal
AB-150	XY	Normal	AB-490	XY	Trisomía 15
AB-155	XX	Normal	AB-494	XX	Normal
AB-162	XY	Normal	AB-495	XX	Normal
AB-171	Sin establecer	Sin establecer	AB-497	XX	Normal
AB-174	XY	Trisomía 13	AB-499	XX	Normal
AB-190	XY	Normal	AB-500	XY	Trisomía 18
AB-209	XX	Normal	AB-502	X	Monosomía X
AB-249	XX	Normal	AB-508	XY	Trisomía 13
AB-253	XX	Normal	AB-509	XXX	Doble trisomía X y 18
AB-302	XY	Trisomía 13	AB-511	XY	Normal
AB-318	XY	Trisomía 18	AB-512	XY	Normal
AB-324	XY	Normal	AB-515	XY	Normal
AB-359	XY	Normal	AB-515	XY	Normal
AB-371*	XY	Trisomía 2	AB-517	XX	Trisomía 22
AB-373	XY	Trisomía 13	AB-522	XX	Normal
AB-379	Sin establecer	Sin establecer	AB-523	XY	Trisomía 7
AB-385	XY	Normal	AB-525	XY	Deleción terminal 18q
AB-416	XX	Trisomía 21	AB-550	XY	Trisomía 18
AB-433	XX	Trisomía 22	AB-551	XX	Normal
AB-439	XY	Normal	AB-554	XX	Normal
AB-479	X	Monosomía X	AB-555	XY	Deleción terminal 6q

Tabla XI. Abortos sin cariotipo estudiados mediante CGH. \*Producto desequilibrado de t(2;17), segregación de intercambio 3:1 (ver Lorda-Sanchez *et al.*, 2005).

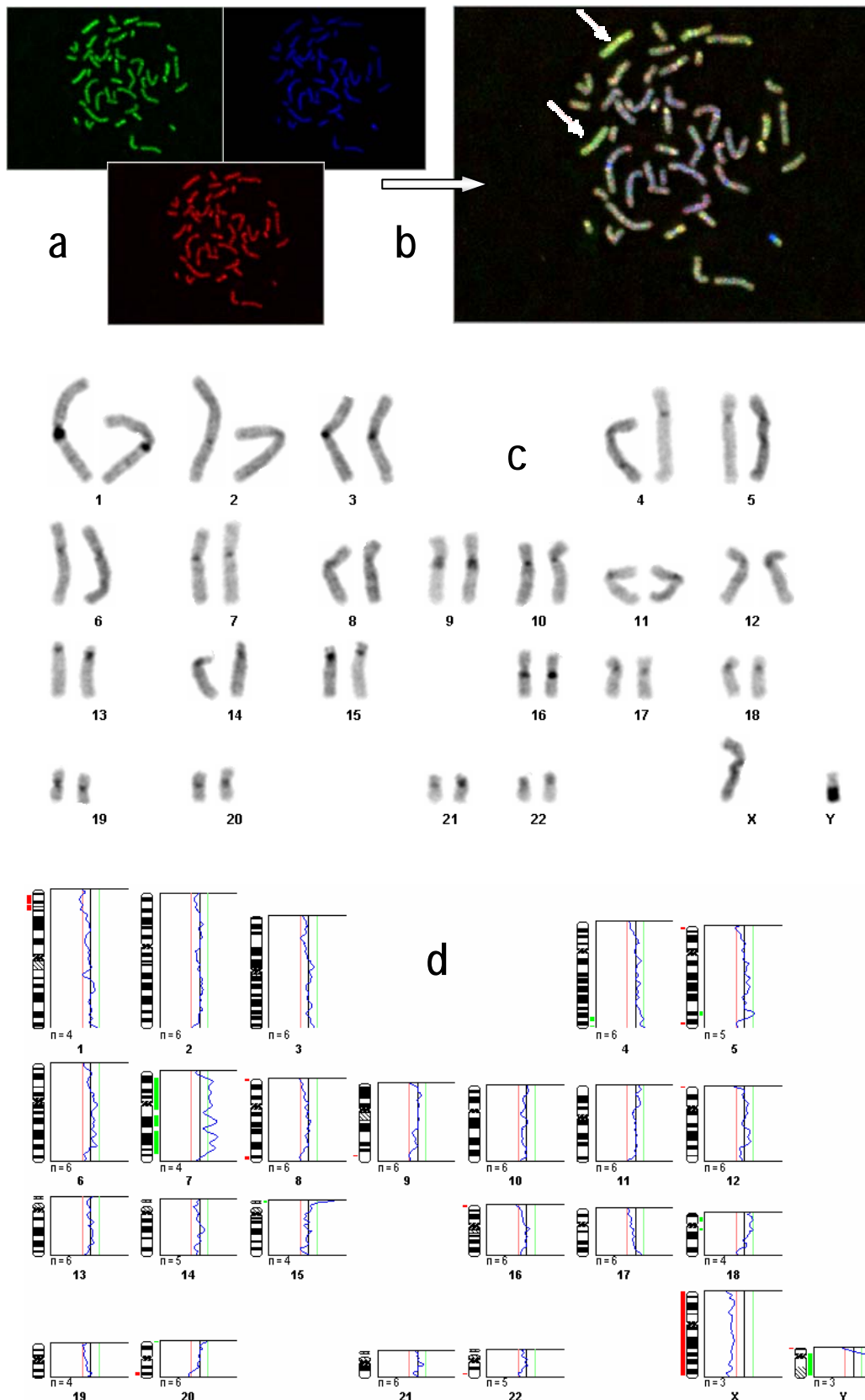


Figura 32. Resultado de la técnica de Hibridación Genómica Comparativa (CGH) en un aborto (AB-523) con fórmula cromosómica 47,XY,+7 (ADN del aborto marcado en verde y ADN control 46,XX marcado en rojo). (a) La integración de las distintas imágenes tomadas por el microscopio de fluorescencia (DAPI, *Spectrum-Green* y *Texas-Red*) ofrece como resultado la imagen mostrada (b), en la que se evidencia un par cromosómico que emite una intensidad de fluorescencia verde superior a la del resto (*flechas*). El análisis (d) procedente de la integración de varios cariotipos (c) evidenciar la presencia de ganancia de material en el par cromosómico 7 (ganancias mostradas en verde, pérdidas mostradas en rojo). El análisis de los cromosomas sexuales revela el sexo masculino de la muestra, siendo  $n$  el número de cromosomas analizados.

### 4.3 – MLPA

#### 4.3.1 - Detección de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales desequilibradas: ensayo de validación

A) Abortos con estudio citogenético (tabla XII):

a) Abortos con cariotipo normal:

El resultado de ambos kits de sondas subteloméricas fue un patrón normal de amplificado para todas las sondas en 38 casos de los 50 que presentaban cariotipo normal (23 casos 46,XY y 27 casos 46,XX).

Algunos resultados adicionales y/o discordantes se observaron en los siguientes casos:

- ab-1: delección de las sondas X/Yq y cariotipo 46,XY.
- ab-10: duplicación de la sonda de 5p CYFIP1 en aborto con cariotipo 46,XX.
- ab-21: duplicación de las sondas de 16p en un aborto con cariotipo 46,XY.
- ab-60: delección de la sonda de 9q MRPL41 en aborto con cariotipo 46,XY.

Los resultados obtenidos en 8 de las 36 muestras que presentaban cariotipo 46,XX resultaron ser causados aparentemente por sobrecrecimiento de contaminación materna en el cultivo, observando resultados incompatibles con el cariotipo indicado:

- ab-27: duplicación de todas las sondas del cromosoma 13 (trisomía 13 confirmada por QF-PCR).
- ab-35: amplificación de las sondas específicas del cromosoma Y (confirmado mediante amplificación del fragmento específico de la amelogénina del cromosoma Y por QF-PCR).
- ab-59: amplificación de las sondas específicas del cromosoma Y (confirmado mediante amplificación del fragmento específico de la amelogénina del cromosoma Y por QF-PCR).
- ab-71: duplicación de todas las sondas del cromosoma 17 (trisomía 17 confirmada por QF-PCR).
- ab-84: duplicación de todas las sondas de los cromosomas 8 y 22 (doble trisomía confirmada mediante QF-PCR).
- ab-120: duplicación de todas las sondas del cromosoma 22 (trisomía 22 confirmada mediante QF-PCR).
- ab-191: duplicación de todas las sondas del cromosoma 13 (trisomía 13 confirmada por QF-PCR).
- ab-192: delección de todas las sondas de X/Y (monosomía X confirmada mediante QF-PCR).

b) Abortos con cariotipo poliploide:

El resultado de MLPA para los 5 casos poliploides fue un patrón de amplificado normal para todas las sondas.

c) Abortos con cariotipo aneuploide:

De entre los 34 abortos con cariotipo aneuploide, 30 presentaban al menos una trisomía y los 4 restantes monosomía X.

Todas las trisomías fueron confirmadas como duplicación de ambas sondas de un cromosoma en ambos kits (ver figura 33) excepto en un caso de trisomía 13 (ab-48), en el que la sonda de 13p en P036B (PSPC1) no apareció duplicada.

En 4 de los 5 casos cariotipados como 45,X se confirmó el resultado citogenético como delección de las sondas X/Yp y X/Yq, mientras que en el ab-179\* sólo se evidenció delección de las sondas X/Yq.

d) Cariotipo con alteración cromosómica estructural desequilibrada:

Se encontró duplicación de las sondas de 20p y delección de las sondas de 20q en el caso de un aborto con portador de una alteración cromosómica estructural desequilibrada entre los cromosomas 18 y 20 (ab-69, figura 34; ver Diego-Alvarez D. *et al.* 2005b, anexo I).

## B) Abortos sin estudio citogenético (tabla XIII):

- Se obtuvo un patrón de amplificado normal para todas las sondas en 68 de los 119 casos.
- Se observó delección o duplicación de una sonda en tres casos (ab-166, ab-177 y ab-213).
- 40 casos presentaron aneuploidía (37 casos con trisomía y 3 monosomía X), un caso de reordenamiento complejo (ab-30) y 3 casos delecciones o duplicaciones terminales (ab-43, ab-89\*\* y ab-210\*\*\*).
- En los restantes 4 casos no se pudo establecer resultado alguno debido a la escasa calidad del patrón de amplificado obtenido para la mayoría de las sondas.

Nota: los casos indicados con asterisco presentan una numeración cifrada distinta a la que podrá aparecer en posteriores apartados del documento, siendo la correspondencia la indicada a continuación:

- ab-179\*: se corresponde con la muestra AB-690 (ver Diego-Alvarez D. *et al.* 2006c, anexo I).
- ab-89\*\*: se corresponde con la muestra AB-555.
- ab-210\*\*\*: se corresponde con la muestra AB-728.



Cariotipo	Muestras	Resultados de MLPA (P036B)	Resultados de MLPA (P070)
26 Masculino normal (46,XY)	23 casos	Patrón normal para todas las sondas; amplificación de las sondas del cromosoma Y (UTY y DBY)	Patrón normal para todas las sondas; amplificación de las sondas del cromosoma Y (UTY y DBY)
	ab-1	<i>Del</i> de X/Yq (SYBL1)	<i>Del</i> de X/Yq (SYBL1)
	ab-21	<i>Dup</i> de 16p (POLR3K)	<i>Dup</i> de 16p (DEC2R2)
	ab-60	<i>Del</i> de 9q (MRPL41)	Patrón normal para todas las sondas
36 Femenino normal (46,XX)	27 casos	Patrón normal para todas las sondas	Patrón normal para todas las sondas
	ab-10	<i>Dup</i> de "15p" (CYFIP1)	Patrón normal para todas las sondas
	ab-27*	<i>Dup</i> de "13p" (PSPC1) y 13q (F7)	<i>Dup</i> de "13p" (PSPC1) y 13q (CDC16)
	ab-35*	Amplificación de las sondas del cromosoma Y (UTY y DBY)	Amplificación de Y (UTY y DBY)
	ab-59*	Amplificación de las sondas del cromosoma Y (UTY y DBY)	Amplificación de Y (UTY y DBY)
	ab-71*	<i>Dup</i> de 17p (RPH3AL) y 17q (TBCD)	<i>Dup</i> de 17p (RPH3AL) y 17q (SECTM1)
	ab-84*	<i>Dup</i> de 8p (FBXO25), 8q (KIAA0150), "22p" (BID) y 22q (RABL2B)	<i>Dup</i> de 8p (FBXO25), 8q (RECQL4), "22p" (IL17R) y 22q (ARSA)
	ab-120*	<i>Dup</i> de "22p" (BID) y 22q (RABL2B)	<i>Dup</i> de "22p" (IL17R) y 22q (ARSA)
	ab-191*	<i>Dup</i> de "13p" (PSPC1) y 13q (F7)	<i>Dup</i> de "13p" (PSPC1) y 13q (CDC16)
	ab-192*	<i>Del</i> de X/Yp (SHOX) y X/Yq (SYBL1)	<i>Del</i> de X/Yp (SHOX) y X/Yq (SYBL1)
5 Poliploide			
69,XXX	1 caso	Patrón normal para todas las sondas	Patrón normal para todas las sondas
69,XXY	2 casos	Patrón normal para todas las sondas; amplificación de las sondas del cromosoma Y (UTY y DBY)	Patrón normal para todas las sondas; amplificación de las sondas del cromosoma Y (UTY y DBY)
92,XXXX	1 caso	Patrón normal para todas las sondas	Patrón normal para todas las sondas
92,XXYY	1 caso	Patrón normal para todas las sondas; amplificación de las sondas del cromosoma Y (UTY y DBY)	Patrón normal para todas las sondas; amplificación de las sondas del cromosoma Y (UTY y DBY)
34 Aneuploide			
Trisomía 5	1 caso	<i>Dup</i> de 5p (PDCD6) y 5q (GNB2L1)	<i>Dup</i> de 5p (LOC133957) y 5q (GNB2L1)
Trisomía 7	2 casos	<i>Dup</i> de 7p (CENTA1) y 7q (VIPR2)	<i>Dup</i> de 7p (UNC84A) y 7q (VIPR2)
Trisomía 10	3 casos	<i>Dup</i> de 10p (KIAA0934) y 10q (PAO)	<i>Dup</i> de 10p (BS69) y 10q (EHS1)
Trisomía 13	2 casos	<i>Dup</i> de "13p" (PSPC1) y 13q (F7)	<i>Dup</i> de "13p" (PSPC1) y 13q (CDC16)
	ab-48	Patrón normal para "13p" (PSPC1) y <i>dup</i> de 13q (F7)	<i>Dup</i> de "13p" (PSPC1) y 13q (CDC16)
Trisomía 15	1 caso	<i>Dup</i> de "15p" (CYFIP1) y 15q (ALDH1A3)	<i>Dup</i> de "15p" (NDN) y 15q (FLJ22604)
Trisomía 16	5 casos	<i>Dup</i> de 16p (POLR3K) y 16q (GAS11 / GAS8)	<i>Dup</i> de 16p (DEC2R2) y 16q (GAS11)
Trisomía 18	3 casos	<i>Dup</i> de 18p (USP14) y 18q (FLJ21172)	<i>Dup</i> de 18p (THOC1) y 18q (CTDP1)
Trisomía 20	ab-175	<i>Dup</i> de 20p (SOX12) y 20q (OPRL1)	<i>Dup</i> de 16p (DEC2R2), 20p (FLJ22115) y 20q (FLJ20517)
Trisomía 21	4 casos	<i>Dup</i> de "21p" (RBM11) y 21q (HMT1)	<i>Dup</i> de "21p" (STCH) y 21q (S100B)
Trisomía 22	1 caso	<i>Dup</i> de "22p" (BID) y 22q (RABL2B)	<i>Dup</i> de "22p" (IL17R) y 22q (ARSA)
Doble trisomía 15, 22	1 caso	<i>Dup</i> de "15p" (CYFIP1), 15q (ALDH1A3), "22p" (BID) y 22q (RABL2B)	<i>Dup</i> de "15p" (NDN), 15q (FLJ22604), "22p" (IL17R) y 22q (ARSA)
Doble trisomía 8, 21	1 caso	<i>Dup</i> de 8p (FBXO25), 8q (KIAA0150), "21p" (RBM11) y 21q (HMT1)	<i>Dup</i> de 8p (FBXO25), 8q (RECQL4), "21p" (STCH) y 21q (S100B)
Doble trisomía 18, 22	1 caso	<i>Dup</i> de 18p (USP14), 18q (FLJ21172), "22p" (BID) y 22q (RABL2B)	<i>Dup</i> de 18p (THOC1), 18q (CTDP1), "22p" (IL17R) y 22q (ARSA)
Doble trisomía X, 18	1 caso	<i>Dup</i> de 18p (USP14), 18q (FLJ21172), X/Yp (SHOX) y X/Yq (SYBL1)	<i>Dup</i> de 18p (THOC1), 18q (CTDP1), X/Yp (SHOX) y X/Yq (SYBL1)
Monosomía X (45,X)	4 casos	<i>Del</i> de X/Yp (SHOX) y X/Yq (SYBL1)	<i>Del</i> de X/Yp (SHOX) y X/Yq (SYBL1)
	ab-167	<i>Del</i> de X/Yp (SHOX) y X/Yq (SYBL1)	<i>Dup</i> de 1p (TNFRSF18) y <i>del</i> de X/Yp (SHOX) y X/Yq (SYBL1)
	ab-179	<i>Del</i> de X/Yq (SYBL1)	<i>Del</i> de X/Yq (SYBL1)
1 Alteración estructural desequilibrada 46,XY,der(18)t(18;20)(q21;p13)mat	ab-69	<i>Dup</i> de 20p (SOX12) y <i>del</i> de 18q (FLJ21172)	<i>Dup</i> de 20p (FLF22115) y <i>del</i> de 18q (CTDP1)
Nº total de casos	102		

Tabla XII. Resultados de MLPA en abortos cariotipados.

Muestras	Resultados de MLPA (P036B)	Resultados de MLPA (P070)	Interpretación de los resultados (cariotipo esperado)
35 casos	Patrón normal para todas las sondas	Patrón normal para todas las sondas	Femenino normal (no diferenciable de poliploide)
33 casos	Patrón normal para todas las sondas; amplificación de las sondas del cromosoma Y (UTY y DBY)	Patrón normal para todas las sondas; amplificación de las sondas del cromosoma Y (UTY y DBY)	Masculino normal (no diferenciable de poliploide)
ab-166	Patrón normal para todas las sondas	<i>Dup</i> de 16p (DECR2)	Posible polimorfismo
ab-177	Patrón normal para todas las sondas	<i>Dup</i> de 16p (DECR2)	Posible polimorfismo
ab-213	<i>Del</i> de 1p (CAB45)	Patrón normal para todas las sondas	Posible polimorfismo
2 casos	<i>Dup</i> de 2p (ACP1) y 2q (CAPN10)	<i>Dup</i> de 2p (ACP1) y 2q (APG4B)	Aneuploide, trisomía 2
1 caso	<i>Dup</i> de 3p (CHL1) y 3q (BDH)	<i>Dup</i> de 3p (CHL1) y 3q (KIAA0226)	Aneuploide, trisomía 3
3 casos	<i>Dup</i> de 7p (CENTA1) y 7q (VIPR2)	<i>Dup</i> de 7p (UNC84A) y 7q (VIPR2)	Aneuploide, trisomía 7
3 casos	<i>Dup</i> de 9p (DMRT1) y 9q (MRPL41)	<i>Dup</i> de 9p (FLJ00026) y 9q (EU-HMTase1)	Aneuploide, trisomía 9
4 casos	<i>Dup</i> de "13p" (PSPC1) y 13q (F7)	<i>Dup</i> de "13p" (PSPC1) y 13q (CDC16)	Aneuploide, trisomía 13
1 caso	<i>Dup</i> de "14p" (HEI10) y 14q (MTA1)	<i>Dup</i> de "14p" (ADPRTL2) y 14q (MTA1)	Aneuploide, trisomía 14
5 casos	<i>Dup</i> de "15p" (CYFIP1) y 15q (ALDH1A3)	<i>Dup</i> de "15p" (NDN) y 15q (FLJ22604)	Aneuploide, trisomía 15
5 casos	<i>Dup</i> de 16p (POLR3K) y 16q (GAS11 / GAS8)	<i>Dup</i> de 16p (DECR2) y 16q (GAS11)	Aneuploide, trisomía 16
2 casos	<i>Dup</i> de 18p (USP14) y 18q (FLJ21172)	<i>Dup</i> de 18p (THOC1) y 18q (CTDP1)	Aneuploide, trisomía 18
5 casos	<i>Dup</i> de "21p" (RBM11) y 21q (HMT1)	<i>Dup</i> de "21p" (STCH) y 21q (S100B)	Aneuploide, trisomía 21
5 casos	<i>Dup</i> de "22p" (BID) y 22q (RABL2B)	<i>Dup</i> de "22p" (IL17R) y 22q (ARSA)	Aneuploide, trisomía 22
1 caso	<i>Dup</i> de X/Yp (SHOX) y X/Yq (SYBL1); amplificación de las sondas del cromosoma Y (UTY y DBY)	<i>Dup</i> de X/Yp (SHOX) y X/Yq (SYBL1); amplificación de las sondas del cromosoma Y (UTY y DBY)	Aneuploide, Klinefelter (XXY)
3 casos	<i>Del</i> de X/Yp (SHOX) y X/Yq (SYBL1)	<i>Del</i> de X/Yp (SHOX) y X/Yq (SYBL1)	Aneuploide, monosomía X (45,X)
ab-30	<i>Dup</i> de X/Yp (SHOX), 18p (USP14) y 18q (FLJ21172)	<i>Dup</i> de X/Yp (SHOX), 18p (THOC1) y 18q (CTDP1)	Reordenamiento complejo: <i>dup</i> X/Yp además de trisomía 18
ab-43	<i>Dup</i> de 21q (HMT1)	<i>Dup</i> de 21q (S100B)	<i>Dup</i> 21q
ab-89	<i>Del</i> de 6q (PSMB1)	<i>Del</i> de 6q (TBP)	<i>Del</i> 6q
ab-210	<i>Del</i> de 2q (CAPN10)	<i>Del</i> de 2q (APG4B)	<i>Del</i> 2q
4 casos	Insuficiente calidad del patrón de amplificado de las sondas	Insuficiente calidad del patrón de amplificado de las sondas	Resultado no establecido
Nº total de casos: 119			

Tabla XIII. Resultados de MLPA en abortos no cariotipados.

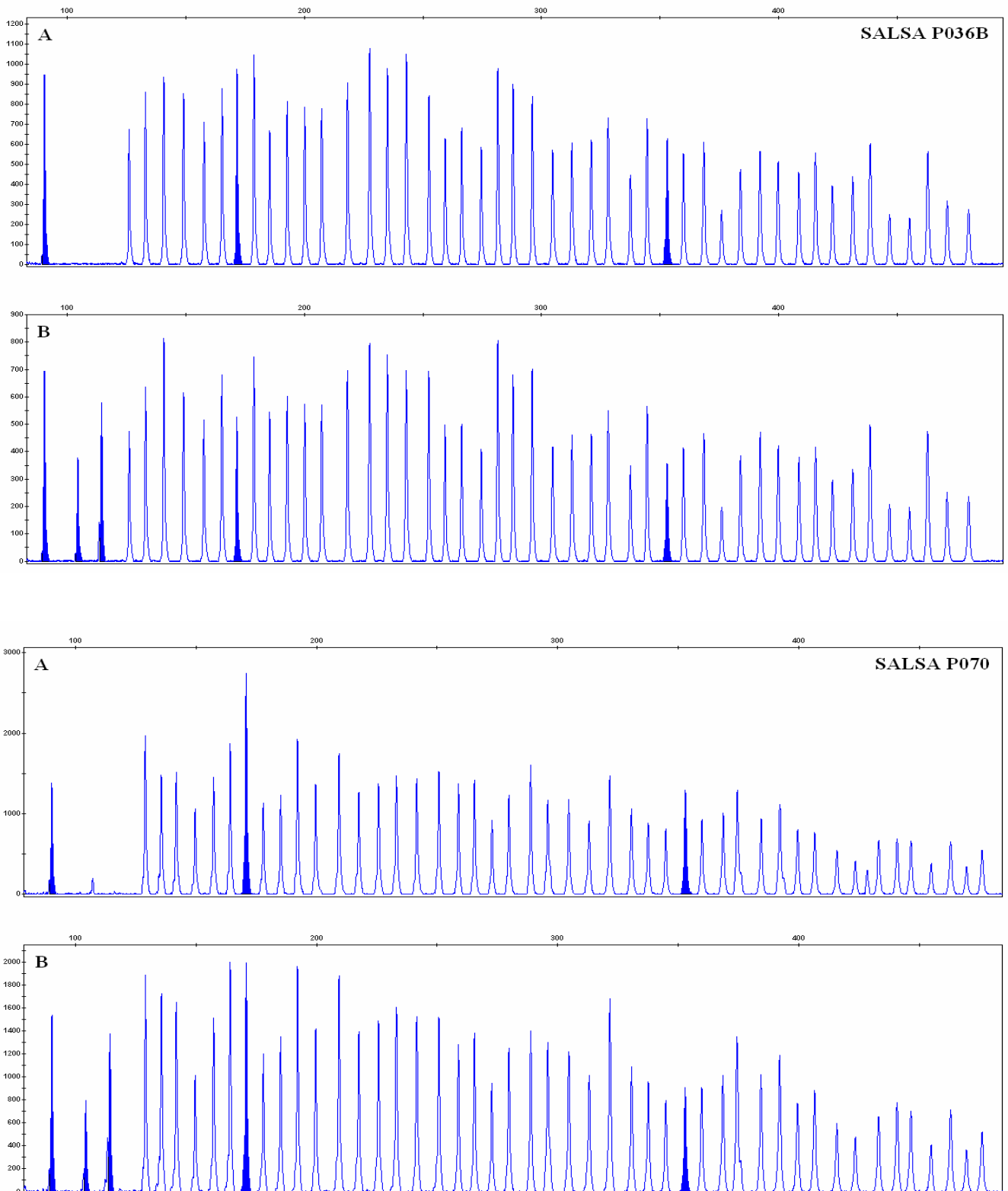


Figura 33. Resultados de MLPA en (A) un aborto 47,XX,+7 y (B) un control 46,XY. Los picos sombreados en P036B corresponden a las sondas SCP (*Synthetic Control Probe*), CENTA1 (7p) y VIPR2 (7q) en A y a las sondas SCP, UTY (Yq11), DBY (Yq11), CENTA1 y VIPR2 en B; los picos sombreados en P070 corresponden a las sondas SCP, VIPR2 (7q) y UNC84A (7p) en A y a las sondas SCP, UTY, DBY, VIPR2 y UNC84A en B. La trisomía 7 se muestra como duplicación de ambas sondas específicas de las regiones subteloméricas del cromosoma 7 para cada uno de los kits como un incremento del 35-50% del área relativa del pico del producto de amplificado de esas sondas con respecto de aquellas en un control normal.

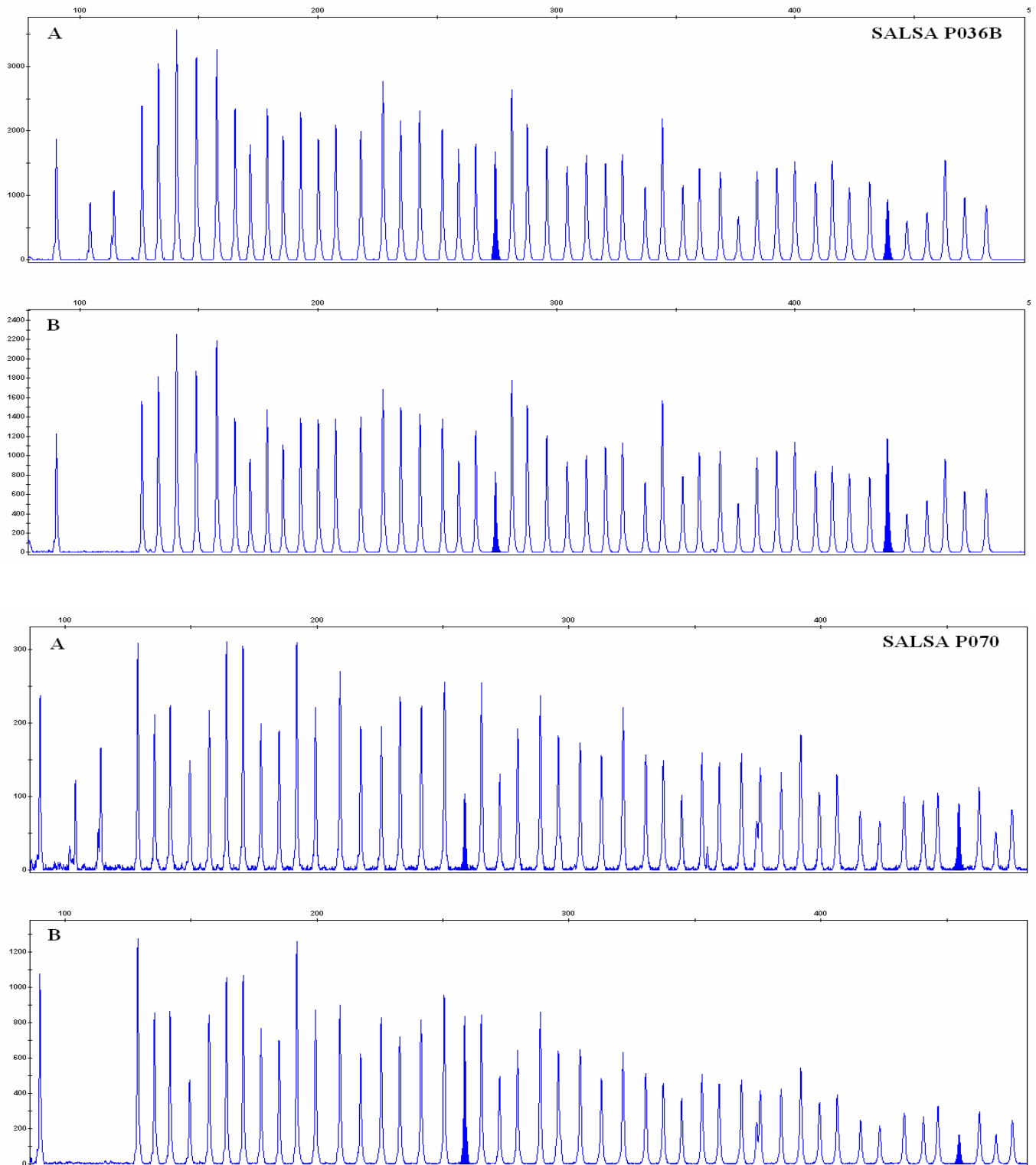


Figura 34. Productos de MLPA para los kits de sondas subteloméricas SALSA P036B y SALSA P070 en (A) el aborto ab-69 [46,XY,der(18)t(18;20)(q21;p13)mat], cuya madre era portadora equilibrada de una translocación [46,XX,t(18;20)(q21;p13)] y (B) un control 46,XX. El eje  $x$  representa la longitud de los productos de la PCR en pb determinada por un marcador interno de peso molecular; el eje  $y$  representa la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias. Los picos sombreados en P036B corresponden a las sondas SOX12 (20p) y FLJ21172 (18q); los picos sombreados en P070 corresponden a las sondas CTD1 (18q) y FLJ22115 (20p). La segregación adyacente-I (no distinguible de una segregación alterna tras un fenómeno de sobrecruzamiento) durante la meiosis genera una combinación de monosomía parcial 18q21>qter (*del* de las sondas de 18q) y trisomía parcial 20p13>pter (*dup* de las sondas 20p) en el cigoto. La delección o duplicación de la secuencia diana de la sonda específica se muestra como variación del 35-50% del área relativa del pico del producto de amplificado generado por esa sonda con respecto del de la misma sonda en un individuo control.

4.3.2 - Detección de mosaicismos cromosómicos

El resultado de la técnica de MLPA para confirmar la presencia del anillo cromosómico del 22 en mosaico en una muestra de diagnóstico prenatal (LA-05/514) confirmó los resultados del cariotipado al observarse un patrón de delección parcial en la muestra de ADN “virgen” (valor relativo de 0,76 para la sonda ARSA *vs.* valor de 1,00 en el control, tabla XIV) y similar al mostrado por la muestra de ADN extraída a partir del cultivo celular, empleada ésta como control de la línea celular en mosaico (0,81), por lo que se descartó que la presencia de ésta fuera debida a un artefacto del cultivo (figura 35).



Figura 35. Detalle de los resultados de MLPA (P070) en (a) control normal, (b) LA “virgen” y (c) cultivo de LA como control positivo de la delección en mosaico. El pico sombreado muestra la sonda ARSA (22q).

P070	Área del pico			Valores relativos		
Sondas	Control	Virgen	Cultivo	Control	Virgen	Cultivo
S100B (21q)	18486	23832	11015	1,00	1,26	1,28
ARSA (22q)	20764	16138	7829	1,00	0,76	0,81
SYBL1 (X/Yq)	18414	19242	8022	1,00	1,02	0,94

Tabla XIV. Resultados de MLPA para la sonda de 22q y adyacentes (P070) en muestra control, LA “virgen” y cultivo respectivamente.

## 4.4 – 1 Mb array CGH

Los resultados obtenidos se muestran y detallan a continuación en la tabla XV y figuras 36 a 39:

Nº caso	Indicaciones	Resultado 1 Mb array CGH
AB-918	Control de aneuploidía (cariotipo 47,XY,+13)	XY, trisomía 13
AB-555	Sin cariotipo; delección 6q terminal detectada mediante CGH	XY, delección 6q25.1-qter de 18,6 Mb
AB-728	Sin cariotipo; delección 2q terminal detectada mediante MLPA	XX, delección del clon GS1-8L3 (telomere G1) en 2p25.3 y de los clones adyacentes RP11-463B12 y RP11-556H17 en 2q37.3
AB-740	Cariotipo 46,XX, sospecha de DWS	XX, no se observan alteraciones
AB-899	Sin cariotipo; trisomía 13 por QF-PCR	XY, doble trisomía 13 y 16
AB-950	Sin cariotipo; feto femenino; QF-PCR y MLPA normal	XX, no se observan alteraciones
BC-3079	Cariotipo 46,XX,t(5;13)(p15.1;q34)	XX, delección de los clones RP11-15G6 (5p13.3) y RP11-513N16 (13q33.3)

Tabla XV. Resultados del array CGH.

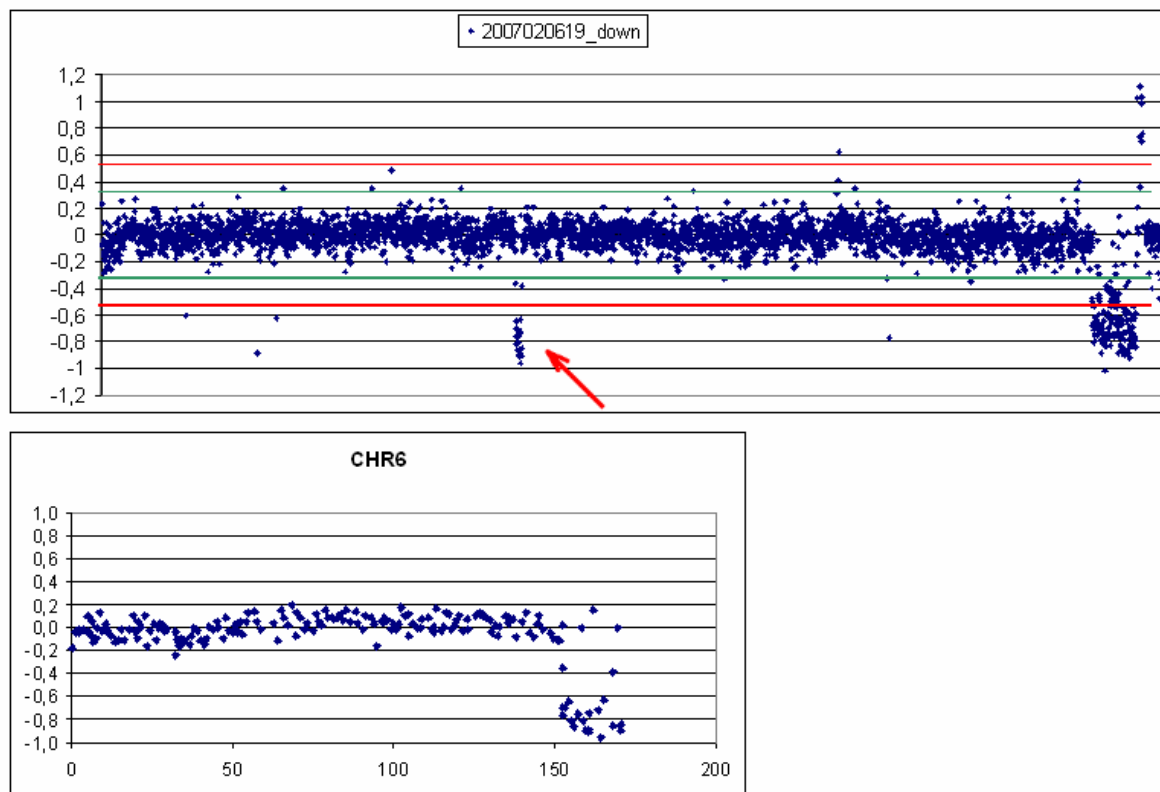


Figura 36. 1 Mb array CGH de la muestra AB-555 (marcada en Cy5) enfrentada contra un control 46,XX. *Superior*, clones de todo el genoma (de izquierda a derecha, y de *p* a *q*, cromosomas 1 al 22, X, Y y extra spots). La delección 6q (*flecha*) se muestra con valores de log<sub>2</sub> inferiores a 0,5 (<4SD). El resto de clones que aparecen con desviación significativa en el mismo gráfico han sido probados como polimórficos en individuos control (CNV). Los cromosomas sexuales en el aborto (XY) se muestran como duplicación de los clones del Y y delección de aquellos únicos del X. *Inferior*, detalle de los clones del cromosoma 6 (de izquierda a derecha, ordenados de *p* a *q*). Nota: valores positivos (>4SD) indican duplicación en la muestra marcada con Cy5 o delección en la marcada con Cy3; valores negativos (<4SD) indican duplicación en la muestra marcada con Cy3 o delección en la marcada con Cy5.

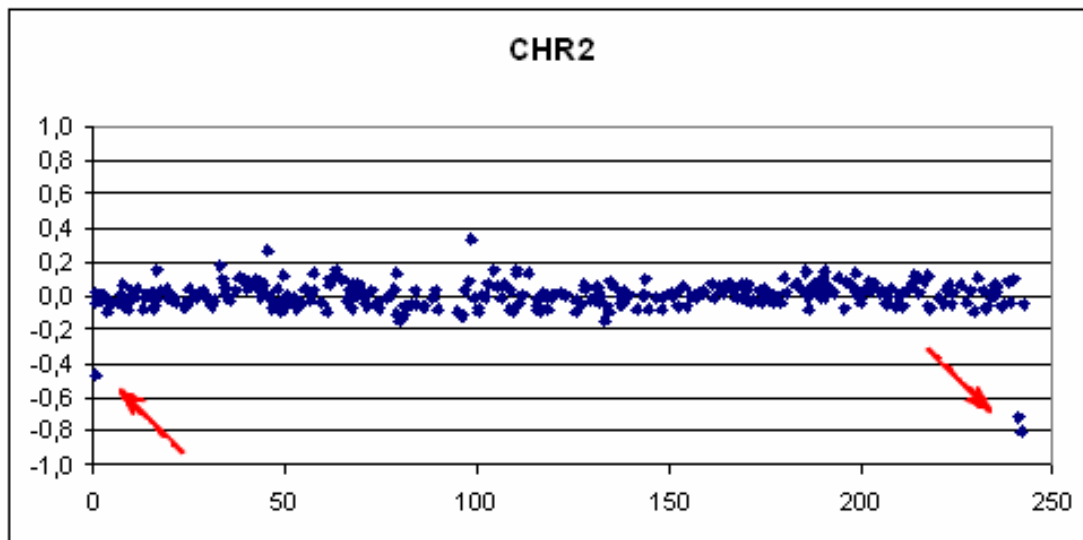


Figura 37. Detalle del cromosoma 2 en la muestra AB-728 (marcada en Cy5) enfrentada con un control normal. Se evidencia la delección de los clones GS1-8L3 (p) y RP11-463B12 y RP11-556H17 con valores de  $\log_2$  inferiores a 0,5 ( $<4SD$ ). Nota: valores positivos ( $>4SD$ ) indican duplicación en la muestra marcada con Cy5 o delección en la marcada con Cy3; valores negativos ( $<4SD$ ) indican duplicación en la muestra marcada con Cy3 o delección en la marcada con Cy5.

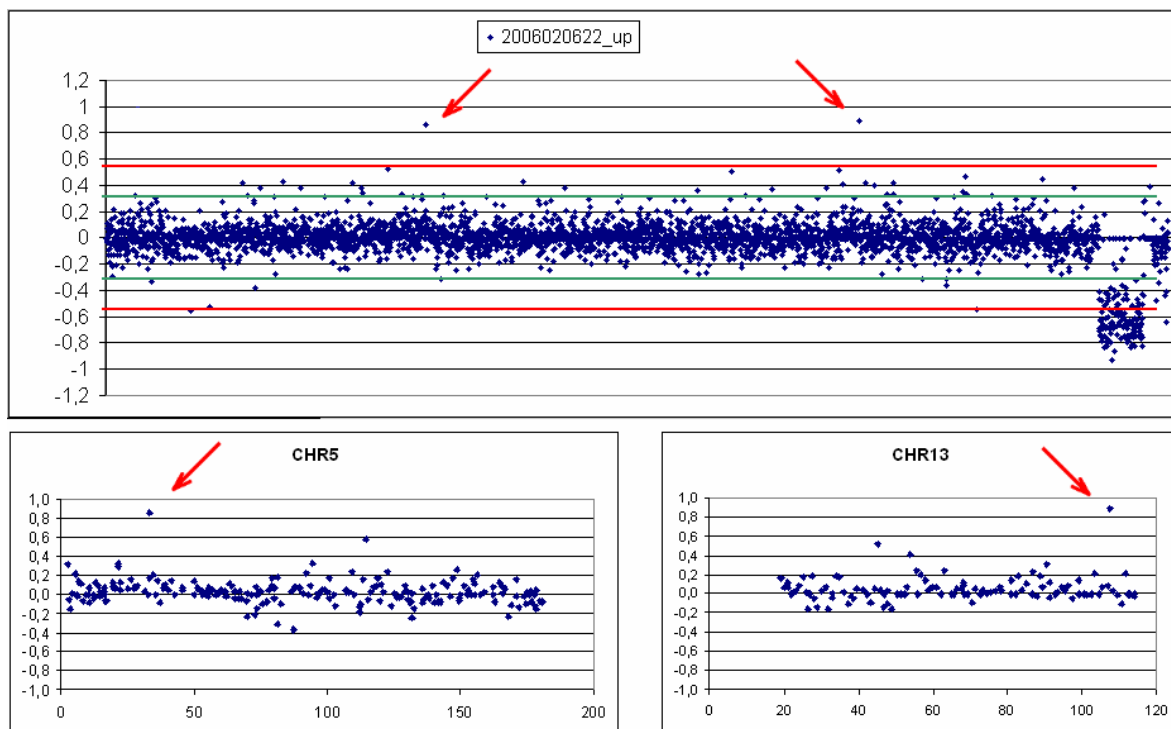


Figura 38. 1 Mb array CGH de la muestra BC-3079 (marcada en Cy3) enfrentada contra un control 46,XY. *Superior*, clones de todo el genoma (de izquierda a derecha, y de  $p$  a  $q$ , cromosomas 1 al 22, X, Y y extra spots). La delección de los clones correspondientes a los puntos de rotura de la translocación entre los cromosomas 5 y 13 (p15.1;q34) se señala mediante flechas. *Inferior*, detalle de los cromosomas 5 y 13 (de izquierda a derecha, ordenados de  $p$  a  $q$ ). Nota: valores positivos ( $>4SD$ ) indican duplicación en la muestra marcada con Cy5 o delección en la marcada con Cy3; valores negativos ( $<4SD$ ) indican duplicación en la muestra marcada con Cy3 o delección en la marcada con Cy5.

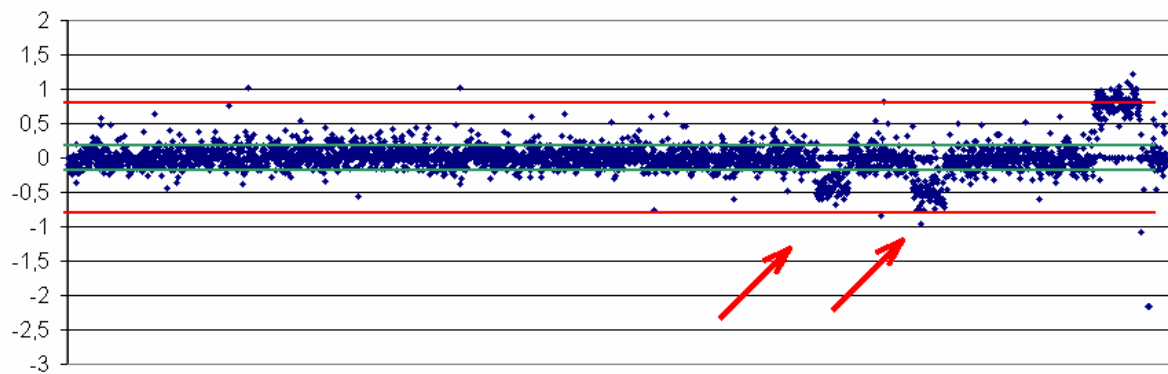


Figura 39. 1 Mb array CGH de la muestra AB-899 (marcada en Cy3) enfrentada contra un control 46,XX. Clones de todo el genoma (de izquierda a derecha, y de *p* a *q*, cromosomas 1 al 22, X, Y y extra spots). Las flechas señalan duplicación de todos los clones de los cromosomas 13 y 16, por lo que se infiere una doble trisomía afectando a estos cromosomas en nuestra muestra. Nota: valores positivos ( $>4SD$ ) indican duplicación en la muestra marcada con Cy5 o deleción en la marcada con Cy3; valores negativos ( $<-4SD$ ) indican duplicación en la muestra marcada con Cy3 o deleción en la marcada con Cy5.



## 5 – DISCUSIÓN

### 5.1 – Consideraciones acerca del procesado y selección de la muestra

El diagnóstico de la causa del aborto disminuye los sentimientos de culpabilidad y responsabilidad generados en la mujer tras sufrir un aborto (Nikcevic *et al.*, 1999) y posibilita el ofrecimiento de un apropiado consejo genético a la pareja (Carp *et al.*, 2001). Sin embargo, por lo general, el estudio cromosómico de los restos abortivos no es solicitado por su médico o ginecólogo hasta que las pérdidas son recurrentes y, en el caso de los pacientes, la mayoría carece de información acerca de la posibilidad de realizar dicho estudio con fines diagnósticos. Puesto que el riesgo de repetición -que se ve indiscutiblemente incrementado con la edad materna debido a la incidencia de aneuploidias en el feto- se ha visto relacionado con el cariotipo y número de abortos previos (Ogasawara *et al.*, 2000; Stephenson *et al.*, 2002; Rubio *et al.*, 2003; Morikawa *et al.*, 2004; Warburton *et al.*, 2004), algunos autores recomiendan el estudio citogenético de éstos desde el primer aborto (Sanchez *et al.*, 1999; Silvestre *et al.*, 2002), sin esperar por tanto a que se produzca una segunda o en ocasiones hasta una tercera pérdida.

No obstante, el estudio citogenético de los restos abortivos por lo general se realiza algunos días después de la pérdida fetal lo que, unido al avanzado estado de maceración de la muestra (caso de abortos diferidos) en algunas ocasiones y a la posible contaminación microbiana tanto intrauterina como en el momento del legrado y traslado de la muestra, limita el éxito del crecimiento del cultivo celular obteniendo un porcentaje de fracaso del cultivo de entre el 10 y el 40% (Lomax *et al.*, 2000), siendo el de nuestro propio laboratorio cercano al 25% para una muestra de 216 abortos (ver Cardero-Merlo R. *et al.* 2006, anexo I). La viabilidad del tejido en el momento del procesado condiciona el crecimiento del cultivo celular, habiéndose observado mejores resultados en el cultivo de cordón, amnion, corion o vellosidades coriales que en los de tejidos propiamente fetales (probablemente debido al avanzado estado de auto lisis de éstos) (Hassold *et al.*, 1980; Johnson *et al.*, 1990; Strom *et al.*, 1992). Mientras que algunos autores reportan tasas de éxito del cultivo del 91,4% empleando vellosidades coriales obtenidas mediante biopsia transabdominal (Sanchez *et al.*, 1999) defendiendo la realización de esta práctica previa a la evacuación quirúrgica de los restos como método de obtención del material óptimo para el estudio citogenético, Greenwold y Jauniaux (2002) reportan una tasa de éxito incluso superior (94,5%) empleando vellosidades coriales obtenidas en el momento del legrado tras la correcta identificación y limpieza de éstas. Estos resultados descartan por tanto la necesidad de realizar un doble procedimiento invasivo a la paciente para la obtención del cariotipo fetal en el estudio de los restos abortivos, minimizando así los posibles perjuicios (sobre todo psíquicos) ocasionados en un momento traumático de por sí.

Otro de los problemas frecuentemente asociados al cultivo de los restos abortivos en particular es la obtención de “falsos” cariotipos femeninos normales como consecuencia de la presencia y sobrecrecimiento en éste de células de origen materno, lo que inicialmente llegó a sesgar la proporción

de abortos con cariotipo normal masculinos frente a femeninos (*ratio* M/F=0,75, N=537; Hassold *et al.*, 1980). La presencia de contaminación materna en algunos de los abortos con cariotipo normal 46,XX fue demostrada por Bell y colaboradores (1999a) mediante la amplificación por PCR y detección en agarosa de secuencias del cromosoma Y en ADN extraído a partir de los restos de tejido almacenados y confirmada posteriormente mediante FISH. En el ensayo de QF-PCR de nuestro estudio, 5 de los casos cariotipados como 46,XX fueron posteriormente confirmados como contaminación materna (los 5 resultaron ser varones, 2 de ellos con trisomía 13). Por otra parte, 3 casos con cariotipo anómalo (47,XY,+9; 47,XY,+10; 69,XXX), resultaron como hembras normales (disómicas) para todos los marcadores cromosómicos empleados mediante la técnica molecular, sugiriendo la posible confusión del tejido analizado molecularmente como fetal por materno. En 2 de los 66 casos en los que no se disponía de cariotipo, se evidenció la presencia de contaminación materna en el mismo ensayo. Por otra parte, los resultados obtenidos en 8 de las 36 muestras que presentaban cariotipo 46,XX estudiados mediante MLPA resultaron ser causados aparentemente por sobrecrecimiento de contaminación materna en el cultivo, observando resultados moleculares incompatibles con el cariotipo indicado (ab-27, ab-35, ab-59, ab-71, ab-84, ab-120, ab-191, ab-192, ver tabla XII). Por ello, la correcta limpieza, identificación y selección de los tejidos de origen fetal de entre los restos abortivos son necesarias y requieren de personal experimentado y capacitado (Menasha *et al.*, 2005).

Mientras que, según nuestra experiencia, en la mayor parte de los casos (sobre todo en aquellos más tempranos) no es posible distinguir la presencia de estructuras propiamente fetales entre los restos abortivos debido a su total ausencia o a su avanzado estado de maceración, las vellosidades coriales por el contrario constituyen el material de elección para el estudio cromosómico de éstos debido a su viabilidad (aumento de la tasa de éxito del cultivo y por lo tanto de obtención de resultados frente al empleo de otros tejidos) y relativa sencillez a la hora de reconocerlas y procesarlas. Sin embargo, la principal desventaja del estudio de este tipo de material reside en la posibilidad de establecer un diagnóstico erróneo debido a la posible presencia de un mosaicismo cromosómico confinado a este tejido. El mosaicismo confinado a la placenta ha sido observado en un 2% de aquellas gestaciones viables estudiadas prenatalmente mediante biopsia de corion (ver revisión de Robinson *et al.*, 1997) y, en la mayoría de los casos, comprende una línea celular trisómica en tejidos placentarios y constitución cromosómica diploide en el feto. El origen del mosaicismo puede ser tanto meiótico (seguido del rescate de la trisomía en la que será la línea celular disómica) como postzigótico (Lorda-Sanchez *et al.*, 1992). Aunque muchas de estas gestaciones llegan a término sin complicaciones (Bartels *et al.*, 1997), algunas pueden resultar en aborto, retraso del crecimiento intrauterino o muerte perinatal (Kalousek, 1994). Sin embargo, el progreso de la gestación depende en amplio grado del cromosoma que se encuentre implicado en la alteración, habiéndose observado un normal desarrollo de ésta en el caso de trisomías de los cromosomas 2, 3, 7 y 8 (Robinson *et al.*, 1997).

La presencia (y detección) de mosaicismos cromosómicos confinados a la placenta puede resultar un inconveniente en el diagnóstico prenatal, ya que el feto puede ser cromosómicamente equilibrado. Sin embargo, en el estudio de abortos podría suponer un posible diagnóstico de la causa de éste. A pesar de que la constitución cromosómica de las estructuras que darán lugar a feto y a anexos embrionarios respectivamente sean distintas, la interrupción de la gestación podría verse influenciada por la dotación cromosómica anormal de la placenta. Tal podría ser el caso en nuestro estudio de la muestra AB-981, en la cual el estudio citogenético concluyó un cariotipo 46,XX (posteriormente descartado como materno) y los estudios moleculares revelaron la presencia de una doble trisomía 7 y 13 en vellosidades coriales pero no en el feto. La presencia de un patrón trisómico trialélico para algunos marcadores de ambos cromosomas revela el origen meiótico de la alteración, habiéndose por tanto podido producir el rescate de ambas trisomías en aquella línea celular del embrión que posteriormente formaría las estructuras fetales. Aun descrito en la literatura como viable (gestaciones a término con mosaicismo de trisomía 7 confinado a la placenta), el efecto adicional de la trisomía 13 en este tejido podría haber sido deletéreo, justificando por tanto el fracaso gestacional. El estudio de este caso ilustra la conveniencia, siempre y cuando éste sea posible, de estudiar distintos tejidos. Qumsiyeh (1998) sugiere además que las alteraciones cromosómicas placentarias pueden ser más determinantes en la pérdida fetal que las propiamente fetales. Estas alteraciones podrían causar cambios en la morfología y normal funcionamiento de la placenta (como el tamaño, la forma, vascularización, y proliferación y apoptosis durante la diferenciación de vellosidades coriales), lo que podría explicar la etiología del aborto y el retraso del crecimiento intrauterino en embriones cromosómicamente anormales (Qumsiyeh *et al.*, 2000).

Por último, en el caso de trisomías confinadas a un tejido (así como en el de translocaciones tanto recíprocas como Robertsonianas), sería aconsejable descartar disomía uniparental de los cromosomas implicados en la alteración en aquellas líneas celulares diploides debido al riesgo superior de presentarla. Algunos estudios sitúan la incidencia de disomía uniparental en un 2,8% de las pérdidas fetales (Fritz *et al.*, 2001b) y revelan que la disomía uniparental de determinados cromosomas parece afectar al desarrollo prenatal pero no postnatal, lo que podría indicar que los efectos de la impronta de esos cromosomas aparecerían relegados exclusivamente a los tejidos placentarios (Robinson *et al.*, 1997).

## 5.2 - Valoración de las técnicas moleculares

### 5.2.1 - QF-PCR

En el ensayo de validación de la QF-PCR (N=160), el cultivo citogenético fracasó en un 36,5% de los casos (54), mientras que la escasa calidad del ADN en 9 muestras (5,6%) no permitió su amplificación por PCR, pudiéndose obtener un resultado molecular en el 94% de las muestras. La escasa

calidad del ADN en estas muestras podría deberse a errores en las primeras fases de puesta a punto del protocolo de extracción (puesto que corresponden a muestras procesadas durante la primera etapa del estudio). Aquellos casos en los que se observó discrepancia entre resultados citogenéticos y moleculares, ésta fue debida a contaminación materna de la muestra, por lo que considerando la causa del error diagnóstico, podemos asumir que no se obtuvo ningún falso positivo ni negativo derivado del empleo de esta técnica. La diferente naturaleza del tejido recogido para el cultivo y para ser almacenado para estudios moleculares, como ya ha sido discutido anteriormente, parece ser la causa del error diagnóstico en tres muestras que presentaban cariotipo anómalo (47,XY,+9; 47,XY,+10; 69,XXX) al ser catalogadas mediante QF-PCR como hembras disómicas para los cromosomas estudiados. La concordancia en el resto de resultados (y en la actualidad contando con la experiencia de una muestra aún mayor, resultados no mostrados) demuestra la fiabilidad de la técnica de QF-PCR. No obstante, en aquellas muestras que resultaron normales mediante QF-PCR y no disponían de cariotipo, no es posible descartar tetraploidía, reordenamientos cromosómicos o alteraciones de otros cromosomas o *loci* no estudiados.

En cuanto al estudio de mosaicismos cromosómicos, la técnica de QF-PCR permite detectar hasta niveles de mosaicismo del 5% según la literatura y nuestra propia experiencia. Sin embargo, la posible presencia de un mosaicismo de este tipo podría pasar inadvertida en la interpretación de los resultados, constituyendo más bien una herramienta de confirmación ante unos hallazgos citogenéticos en este tipo de casos (ver Plaza *et al.*, 2007).

El empleo de la técnica de QF-PCR en el diagnóstico y clasificación de molas hidatidiformes ha demostrado su sensibilidad en el estudio de 5 muestras. El error diagnóstico de clasificación cometido en base a criterios morfológicos en 2 de los casos podría haberse debido a la dificultad (especialmente propiciada por una temprana detección y evacuación de los tejidos anómalos) que entraña el estudio de este tipo de patologías. Por ello, los métodos basados en el estudio y determinación de la constitución cromosómica de las molas mediante PCR (Takahashi *et al.*, 1991; Bell *et al.*, 1999b; Petignat *et al.*, 2003) representan, más que aquellas que determinan su ploidía mediante FISH (Yver *et al.*, 2004), una alternativa rápida, precisa y eficaz para el estudio de éstas (ver Diego-Alvarez D. *et al.* 2007a en el anexo I). En la actualidad, se pretende llevar a cabo un estudio retrospectivo más extenso con la colaboración del Servicio de Anatomía Patológica de la FJD con el objeto de evaluar el empleo de la técnica de QF-PCR en multiplex para el diagnóstico y correcta clasificación de molas hidatidiformes, incluso en material preservado en bloques de parafina.

El origen de la aneuploidía en las dobles trisomías estudiadas resultó ser materno y meiótico en todos los casos. Aunque la disyunción en la primera división meiótica materna parece ser el origen más común de las trisomías simples, existe variabilidad en función del cromosoma implicado y un posible origen mitótico no ha de ser descartado (Nicolaidis y Petersen, 1998). Mientras que la mayoría de las

trisomías completas (no mosaicos) de los cromosomas acrocéntricos (13-15, 21 y 22) (Zaragoza *et al.*, 1994) y el cromosoma 16 son atribuidas a errores en la primera división meiótica materna (MI) (Hassold *et al.*, 1996; Koehler *et al.*, 1996), la trisomía 18 es mayoritariamente asociada a errores que ocurren en la segunda división meiótica materna (MII) (Fisher *et al.*, 1995). Sólo un 5-15% de aquellos casos de trisomía 15, 18 y 21 de origen materno son atribuibles a errores postzigóticos. Por su parte, los errores en la meiosis paterna son relativamente raros y comprenden al rededor del 10% de la totalidad de los casos estudiados con un origen meiótico involucrando a los cromosomas acrocéntricos (Robinson *et al.*, 1999). Más aún, el origen meiótico paterno nunca ha sido observado en casos de trisomía 16 (Hassold *et al.*, 1995) y raramente en aquellos de trisomía 18 (Eggermann *et al.*, 1996; Bugge *et al.*, 1998). Nuestros resultados pues son consistentes con los reportados en la literatura, siendo el origen de la doble trisomía materno en todos los casos, MI en AB-407 (48,XX,+15,+22) y AB-487 (48,XX,+8,+21) y MII en AB-509 (48,XXX,+18). Con respecto al caso AB-605 (48,XY,+18,+22), un error en MI parece ser responsable de la trisomía 22 y otro en MII responsable de la 18, situación similar a la que ocurría en el caso AB-981, anteriormente citado. Este caso (AB-605) ilustra la posibilidad de que ocurran dos errores de no disyunción afectando a dos cromosomas distintos en diferentes divisiones meióticas según los patrones más comunes de no disyunción para cada cromosoma, lo que sugiere que un mecanismo común podría estar implicado en las simples y dobles trisomías. Aun bien conocidos los patrones más frecuentes de no disyunción de los cromosomas anteriormente descritos, por el momento no existen estudios relacionados con el origen de las trisomías de otros cromosomas, por lo que en un intento de comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a éstas, un amplio número de casos con trisomía afectando a otros cromosomas deberían ser estudiados. En el estudio de los casos que presentaron trisomía recurrente, el origen materno se observó en la mayoría de los casos acorde a los hallazgos previos. La presencia de heterotrisomía en todos ellos nos lleva a descartar la posible presencia de un mosaicismo cromosómico gonadal en las parejas estudiadas como causa más probable de la aneuploidía en estos casos.

Aunque ampliamente extendida en el campo del diagnóstico prenatal, hasta el momento no existe referencia alguna a parte de nuestro propio trabajo (Diego-Alvarez *et al.*, 2005) acerca del uso rutinario de la técnica para el estudio de restos abortivos, aunque nos consta que otros grupos están trabajando en ello (Ivana Primost y Roberto Coco, Instituto de Medicina Reproductiva – Universidad de Buenos Aires).

Nota sobre el empleo de la QF-PCR: durante el desarrollo del trabajo experimental presentado en este estudio, se comenzaron a poner a punto diversas multiplex con marcadores STR de todos los cromosomas. A principios de 2005, comenzaron a comercializarse los kits de MLPA con sondas subteloméricas, con los que en una sola multiplex se obtenía información de todos los cromosomas. La laboriosidad de poner a punto nuevas PCR multiplex y las prestaciones ofrecidas por esta nueva y prometedora técnica propiciaron el abandono de la idea inicial frente al uso del MLPA.

### 5.2.2 - CGH

Los primeros trabajos en los que se reporta la aplicación de la técnica de CGH (hasta aquel momento sólo destinada al estudio de muestras tumorales) al estudio de restos abortivos (Daniely *et al.*, 1998, 1999), incluso en muestras parafinadas (Ozcan *et al.*, 2000; Bell *et al.*, 2001), supusieron un enorme avance al solventar las limitaciones que el cultivo de este tipo de muestras conlleva. Más aún, el estudio de algunas muestras de abortos del primer trimestre (hasta la 10ª semana de gestación) cuyo cultivo fracasó (Fritz *et al.*, 2001a) reveló la presencia suprarrepresentada de alteraciones poco observadas mediante cariotipado convencional como la trisomía 7 y la triploidía del tipo XYY. Asimismo, la elevada tasa de alteraciones detectadas mediante CGH en estas muestras (72%, N=57) frente a la frecuencia de alteraciones observada en muestras en las que se pudo establecer un cariotipo (64,8%, N=6631) sugiere que la mayoría de aquellas muestras en las que el cultivo fracasa sean cromosómicamente anormales y que posiblemente se infraestime la incidencia de cromosomopatías en abortos espontáneos. En el 5% de los casos (N=60), no pudo establecerse un resultado debido a la obtención de una señal de hibridación pobre y poco homogénea. Similares resultados de fracaso de la técnica (4,8%, N=21) se reportan en el estudio de Tabet y colaboradores (2001), coincidiendo con los de nuestro propio estudio (3,8%, N=52).

En nuestra experiencia, el resultado molecular obtenido mediante CGH concordó en las 6 muestras que disponían de cariotipo con éste, no obteniéndose por tanto ningún falso negativo. En 44 de los casos de entre aquellos 46 en los que no se disponía de estudio citogenético se pudo establecer un resultado. Veintiséis de los casos resultaron normales (no pudiéndose descartar poliploidía, desequilibrios inferiores a 3 Mb o reordenamientos equilibrados, al igual que en todos los trabajos citados anteriormente), 15 aneuploides y 2 con deleciones terminales (confirmados mediante QF-PCR y posteriormente MLPA). En uno de estos casos (AB-525), se determinó una deleción 18q (producto de una translocación entre los cromosomas 18 y 20 como más adelante se pudo comprobar) pero no se pudo detectar la duplicación 20p debido al escaso tamaño de ésta y a la limitación de la propia técnica para evaluar regiones pericentroméricas y subteloméricas de los cromosomas (Daniely *et al.*, 1998). Finalmente, en 2 de los casos (3,8%) no pudo establecerse resultado alguno posiblemente debido a la escasa calidad del ADN, a errores en el protocolo de marcaje o hibridación y lavado, o a la insuficiente calidad de las imágenes capturadas e intensidades de fluorescencia obtenidas.

La laboriosidad de la técnica además de su coste relativamente elevado y el tiempo requerido para el análisis (captura de imágenes y cariotipado) hace que con herramientas más robustas y sensibles como de las que se dispone hoy en día (array CGH) se desaconseje su uso para el estudio de este tipo de muestras.

### 5.2.3 - MLPA

En el ensayo de validación de la técnica de MLPA con kits de sondas subteloméricas (P036B y P070) se emplearon 221 muestras, 102 de las cuales disponían de estudio citogenético. Los resultados obtenidos en estas muestras demuestran la fiabilidad de la técnica para detectar tanto aneuploidías completas como reordenamientos cromosómicos terminales desequilibrados de todos los cromosomas. Sin embargo, salvando aquellos casos cuyo origen resultó ser tejido materno (ab-27, ab-35, ab-59, ab-71, ab-84, ab-120, ab-191, ab-192, ver tabla XII), se encontraron algunos resultados discordantes de entre aquellos en los que se disponía de cariotipo:

-Tanto la delección de las sondas de X/Yq en el ab-1 (46,XY), como la duplicación de las sondas de 16p en el ab-21 (46,XY), y la obtención de un patrón normal de amplificado para las sondas de X/Yp en el ab-179 (45,X; ver Diego-Alvarez D. *et al.* 2006c en el anexo I) (en cada caso, para ambos kits) podrían ser explicadas no como falsos positivos, sino como alteraciones submicroscópicas no reveladas mediante la resolución del cariotipo convencional realizado en estas muestras (400-450 bandas).

-Por su parte, la duplicación o delección de una sola de las dos sondas de cada brazo cromosómico (ab-10, ab-60, ver tabla XII) podría ser debida a la presencia de un polimorfismo o SNP en la secuencia diana de la sonda (impidiendo la ligación y por tanto la amplificación de ésta) o a que se trate de una región polimórfica en número de copia o CNV. Para demostrar la presencia de alguno de estos dos polimorfismos (lo más probable, heredados) sería necesario ADN de los padres.

-De entre aquellos abortos en los cuales no se disponía de cariotipo, pero que contaban con un resultado molecular previo, el ab-48 (trisomía 13) mostró duplicación de todas las sondas del cromosoma 13 excepto de PSPC1 ("13p") en P036B. Como en los casos anteriores, bien podría deberse a la presencia de algún polimorfismo en la secuencia diana de esta sonda. Además, otras tres muestras presentaron duplicación de una sola sonda (ab-166, ab-177 y ab-213; ver tabla XIII) aunque por el momento, no ha podido ser confirmado que se trate de polimorfismos.

Teniendo en cuenta las limitaciones de la técnica (incapacidad para detectar reordenamientos equilibrados y poliploidías) y asumiendo la sospecha de trisomía o monosomía / anillo cromosómico cuando ambas sondas de cada brazo cromosómico para ambos kits empleados aparecen duplicadas o delecionadas respectivamente, no se ha obtenido ningún falso negativo en este estudio de validación. Sin embargo, la posible presencia de polimorfismos en la secuencia diana de algunas sondas hace proponer como poco aconsejables las detalladas a continuación: CAB45 (1p), CYFIP1 ("15p") y MRPL41 (9q) de P036B y TNFRSF18 (1p) y DECR2 (16p) de P070 (recientemente, el kit P036B ha sido reemplazado por el P036C, que contiene sondas distintas para 1p, "15p", 4q y 9q con respecto al anterior).



Por último, en 4 de los 210 casos estudiados no fue posible establecer resultado alguno debido a la escasa calidad del patrón de amplificado obtenido, lo que sitúa la tasa de fracaso de esta técnica en torno al 2% de las muestras procesadas.

Aunque algunos autores ya han validado la técnica de MLPA para el estudio de aneuploidías frecuentes en diagnóstico prenatal con el kit SALSA P095 (contiene sondas para los cromosomas 13, 18, 21 y sexuales) (Gerdes *et al.*, 2005; Hochstenbach *et al.*, 2005), por el momento sólo un estudio más describe el empleo de los kits de sondas subteloméricas para el estudio de aneuploidías en abortos espontáneos (Bruno *et al.*, 2006). En dicho trabajo, los autores reportan los resultados de su experiencia con 178 casos. Al igual que en nuestro estudio, detectan todas las aneuploidías completas en abortos cariotipados así como alteraciones estructurales presentes en su muestra. Como era de esperar, la poliploidía no pudo ser detectada, si bien un caso de triploidía con disomía del 22 es mostrado como una aparente monosomía del 22. Asimismo, no se reportan resultados falsos positivos ni negativos derivados del mismo estudio. Aún más, en ningún momento se alude en el mismo a la posible presencia de polimorfismos lo que, a nuestro juicio, constituye una de las principales limitaciones a la hora de interpretar ciertos resultados obtenidos mediante esta técnica. La presencia de polimorfismos del tipo SNP y CNV podría dar lugar a falsos positivos y negativos, lo que conlleva la necesidad de emplear más de un kit y/o de validar posteriormente los resultados anómalos mediante el empleo de FISH o QF-PCR. Además, el estudio en ADN de los padres sería recomendable para confirmar los resultados ante la posible presencia de dichos polimorfismos.

Otra de las características de la técnica reside en su limitada capacidad para detectar mosaicismos. La detección de éstos dependerá del grado o proporción en que aparezca en el tejido seleccionado para su estudio. Sin embargo, la aplicación puntual de esta técnica para la confirmación de un resultado dudoso puede ser definitiva a la hora de poder establecer un diagnóstico preciso, como se muestra en el caso descrito en el presente trabajo (LA-05/514).

A pesar de las citadas limitaciones, una de las principales ventajas del MLPA consiste en su rapidez y fiabilidad en el estudio de desequilibrios cromosómicos terminales en gestaciones de portadores de translocación en las que, en un tiempo inferior a 24 h, permite establecer si la dotación cromosómica del feto es equilibrada o no (previo conocimiento o no de la translocación parental). Ésto es aplicable no sólo al estudio de abortos, sino al diagnóstico prenatal en gestaciones en curso mediante el estudio de vellosidades coriales (ver el caso BC-3114, Diego-Alvarez *et al.* 2007c en el anexo I), lo que constituye una alternativa más rápida, informativa (descarta a la vez aneuploidías de todos los cromosomas), económica, fiable y eficaz a la técnica de FISH en interfase para el estudio de derivados de translocación y para la que además se requiere una cantidad mínima material. No obstante, la eficacia y eficiencia de esta técnica para su inclusión en el llamado *screening* rápido prenatal de cromosomopatías en

vellosidades coriales se valorará próximamente en un estudio retrospectivo (Diego-Alvarez *et al.*, trabajo en preparación).

#### 5.2.4 – 1 Mb array CGH

Desafortunadamente, debido mayoritariamente al escaso tiempo disponible una vez puesto a punto en el laboratorio y optimizado el protocolo de array CGH, pudieron ser testadas pocas muestras mediante esta técnica. Sin embargo, los resultados obtenidos indican la conveniencia de su uso para la detección tanto de aneuploidías completas como de alteraciones submicroscópicas con un elevado poder de resolución. Los resultados de otros grupos muestran resultados prometedores. Schaeffer y colaboradores (2004) emplean la técnica en 41 abortos de menos de 20 semanas de edad gestacional cuyo resultado citogenético se conocía previamente. Además de obtener los resultados esperados, en 4 de los casos se observaron alteraciones submicroscópicas inesperadas como trisomía 20 en mosaico adicional a una trisomía 21 previamente conocida, delección 9p21 en un aborto con trisomía 13, duplicación 15q adicional a una trisomía 16 y duplicación 10q subtelomérica en un último caso cuyo cariotipo resultó 46,XX. En el estudio llevado a cabo por Le Caignec y colaboradores (2005) se analizaron 49 fetos cuya gestación concluyó en IVE o aborto espontáneo, cuyo cariotipo resultó normal y el estudio anatomopatológico posterior reveló la presencia de al menos 3 malformaciones. Los resultados del estudio muestran la presencia de desequilibrios genómicos que podrían ser causativos de las malformaciones (*de novo*) en 5 de los 49 casos. Por su parte, Benkhalifa y colaboradores (2005) realizan array CGH en 26 casos de abortos espontáneos de 9 a 11 semanas de gestación cuyo cultivo citogenético fracasó. Los resultados obtenidos mostraron que 6 de los 15 abortos aneuploides presentaban 2 anomalías cromosómicas cada uno, apareciendo además la monosomía autosómica suprarrepresentada (en 5 casos de los 15 aneuploides) en comparación con las frecuencias de ésta reportadas en la literatura. En un último estudio (Shimokawa *et al.*, 2006) llevado a cabo en 20 abortos espontáneos (5-12 semanas de gestación) cuyo cariotipo resultó normal, se reportó la presencia de alteraciones submicroscópicas en dos muestras. Posteriormente a los hallazgos moleculares se reexaminaron ambas muestras, pudiéndose identificar citogenéticamente esta vez la alteración en uno de los casos (delección de 13,7 Mb en 13q), pero no en el otro. En base a los resultados obtenidos en este estudio, los autores postulan que en torno al 5% de los abortos con cariotipo normal podrían presentar anomalías submicroscópicas detectables mediante técnicas moleculares.

Los resultados obtenidos en nuestras muestras corroboran la utilidad de la técnica en la detección de aneuploidías completas (AB-899; AB-918), además de demostrar la utilidad de ésta en la caracterización y determinación de los puntos de rotura y el tamaño de los segmentos cromosómicos implicados en translocaciones –siempre y cuando exista pérdida de material cromosómico– (BC-3079) y delecciones (AB-555; AB-728) o duplicaciones. Una vez más, la utilidad del empleo de diferentes técnicas

se ilustra en el caso AB-728, cuyo estudio molecular previo (MLPA y posterior confirmación mediante análisis de microsatélites) había revelado la presencia de una delección terminal del brazo largo del cromosoma 2. Sin embargo, mediante array CGH pudo detectarse además la delección de un clon subtelomérico del brazo corto del mismo cromosoma no revelada mediante MLPA (P036B y P070). Los hallazgos sugieren la posibilidad de que se trate de un anillo del cromosoma 2 con pérdida de secuencias subteloméricas de al menos 1 Mb en 2p y 2 Mb en 2q. Desafortunadamente, el cultivo celular en esta muestra fracasó, por lo que no se pudo demostrar fehacientemente que se tratara de un r(2). Por otra parte, la observación de un clon delecionado en cada uno de los puntos de rotura de una translocación *de novo* aparentemente “equilibrada” entre los cromosomas 5 y 13 en una muestra de diagnóstico prenatal (BC-3079) complicó el consejo genético a la pareja, ofrecido en base a los hallazgos citogenéticos, debido al desconocimiento de la posible repercusión de la delección de estos clones. Pese a la incertidumbre acerca de la posible repercusión fenotípica de la translocación, la pareja decidió seguir adelante con el embarazo. El difícil caso que nos ocupa plantea los inconvenientes que pueden surgir ante la obtención de resultados difícilmente interpretables y cuya repercusión nos es por el momento impredecible. Considerando la posible información derivada del empleo del array CGH (y otras técnicas de elevado poder de resolución), su aplicación en el diagnóstico prenatal debería ser acorde con -y limitada por- las posibilidades de ofrecer un adecuado consejo genético a la pareja.

Una de las principales limitaciones de la técnica, y en referencia al caso anteriormente expuesto, es la interpretación de resultados a la hora de valorar como causativas o polimórficas algunas duplicaciones o delecciones de clones dispersos o adyacentes, pudiéndose tratar de polimorfismos o variantes en número de copia (CNV) de regiones del genoma. Se han descrito un total de 1.447 regiones variables en número de copia (abarcando 360 Mb, más del 12% del genoma, y en ocasiones englobando centenares de genes) en un estudio de 270 individuos con ancestros europeos, asiáticos o africanos (Redon *et al.*, 2006). Sin embargo, para comprender la trascendencia de este tipo de variaciones a lo largo del genoma y su implicación en la predisposición a determinadas enfermedades deberá ser valorada en un amplio estudio de asociación.

En cuanto al protocolo y otras consideraciones a tener en cuenta a la hora de establecer la técnica de array CGH se ha de destacar la laboriosidad y la inversión de tiempo requerida para su puesta a punto y optimización. Además de presentar un gran número de pasos críticos en los que la calidad del proceso anterior ha de valorarse antes de poder proseguir con el protocolo (estado de conservación, concentración y pureza del ADN; incorporación del fluorocromo a la sonda en la reacción de marcaje; control de la temperatura y humedad durante el proceso de hibridación; ajuste de pH y temperatura de las soluciones de lavado), agentes externos como la elevada temperatura y concentración de ozono ambiental disminuyen la intensidad de fluorescencia de la sonda marcada debido a la rápida degradación de Cy3, impidiendo obtener resultados con ciertos criterios de calidad y fiables si estas condiciones no

son controladas en el laboratorio. Asimismo, la exposición a la luz ha de ser evitada en todo momento con objeto de minimizar la pérdida de intensidad de fluorescencia.

Finalmente, a modo de resumen, se presentan las principales ventajas, limitaciones y aplicaciones de las técnicas citadas en el presente trabajo (tabla XVI).

### 5.3 – Protocolo óptimo recomendado para el estudio de alteraciones cromosómicas en abortos espontáneos

En base a la experiencia, los conocimientos adquiridos y los resultados obtenidos con las técnicas anteriormente descritas en el estudio de alteraciones cromosómicas en restos abortivos y, valorando la relación coste / beneficio (informatividad, fiabilidad y rapidez en la obtención de resultados), proponemos el siguiente protocolo para su estudio rutinario (figura 40):

Tras la limpieza y correcta selección del tejido embrionario obtenido tras legrado (vellosidades coriales, feto y/o cordón umbilical, recomendando procesar distintos tejidos de cada espécimen) excluyendo los posibles restos de decidua materna y coágulos de sangre, parte del material ha de ser destinado al cultivo citogenético para su posterior cariotipado y otra parte (incluyendo una muestra de decidua materna) a la extracción de ADN para realizar los estudios moleculares paralelos en cada caso indicados. Además, se recomienda almacenar (-20°C) una muestra del material siempre que sea posible.

De manera general, los estudios moleculares deberían consistir en la realización de QF-PCR en multiplex como primera y rápida aproximación que permitirá descartar triploidía, molas completas homocigotas, contaminación materna y aneuploidías comunes. Si la calidad de la muestra así lo indica y no se observa poliploidía, debería realizarse MLPA con al menos dos kits de sondas subteloméricas para descartar tanto reordenamientos terminales desequilibrados como aneuploidías de todos los cromosomas.

Los resultados obtenidos mediante las técnicas moleculares permiten detectar la mayor parte de las alteraciones cromosómicas frecuentes descritas en abortos espontáneos (a excepción de la tetraploidía, con una frecuencia estimada del 5% de entre todas las alteraciones). El análisis conjunto de los resultados vertidos por éstas y el cariotipo (en aquellos casos en los que éste halla podido establecerse) nos permitirá establecer un resultado en la mayoría de los casos. Aunque indicado en aquellos casos que presenten alteraciones estructurales o numéricas parciales para delimitar el tamaño, contenido génico de éstas y puntos de rotura en el caso de reordenamientos cromosómicos, su elevado coste por el momento no justifica el empleo de array CGH para el estudio rutinario de todos los restos

abortivos. Por otra parte, el uso de la técnica de CGH convencional se desaconseja debido a su laboriosidad, elevado consumo de tiempo para su análisis, limitada resolución y coste.

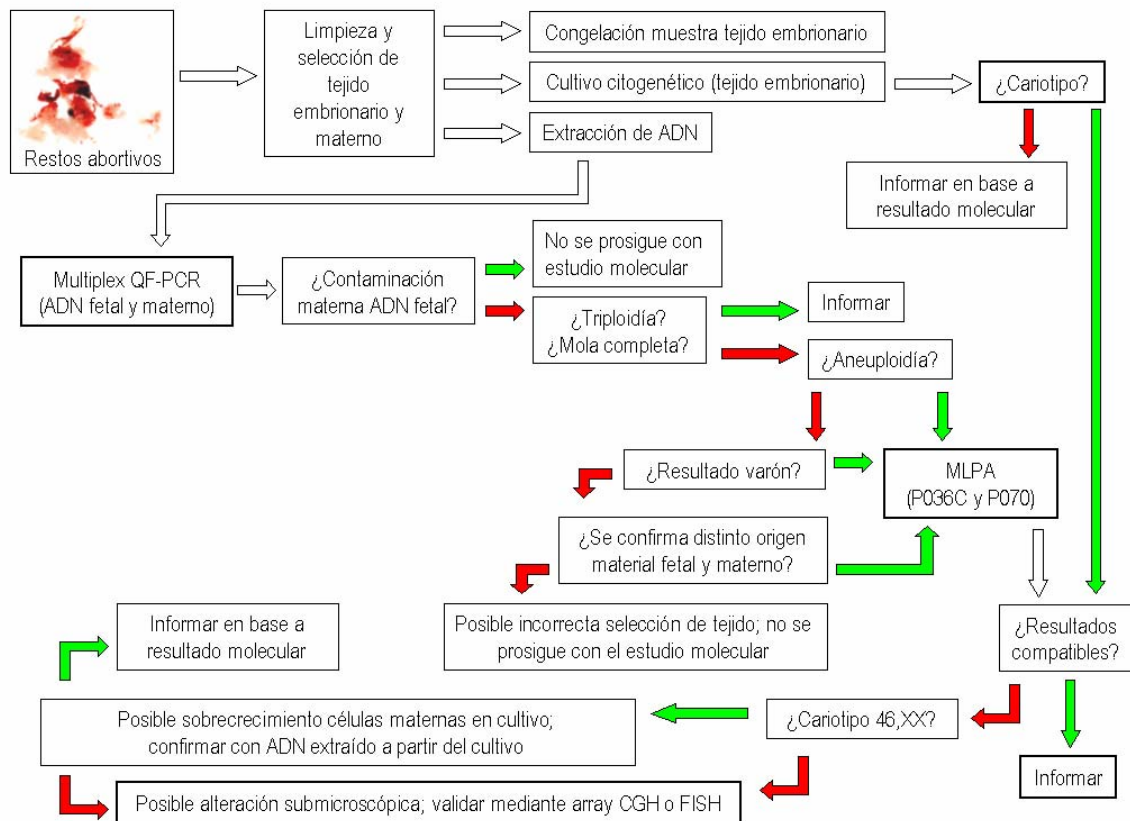


Figura 40. Protocolo óptimo recomendado para el estudio de alteraciones cromosómicas en abortos espontáneos. Clave de colores: *verde*, respuesta afirmativa; *rojo*, respuesta negativa.

#### 5.4 – Acerca de la conveniencia de reevaluar la incidencia de alteraciones cromosómicas en abortos espontáneos y parejas con abortos de repetición

Las anomalías cromosómicas son moduladoras de la viabilidad de la gestación, pudiendo operar negativamente durante el desarrollo embrionario afectando al fenotipo y funcionalidad de la placenta y el feto e incluso en estadios más tempranos tras la fecundación (Benkhalifa *et al.*, 2003, 2004; Kahraman *et al.*, 2004), pasando con frecuencia inadvertida una interrupción del embarazo al asemejarse a un retraso de la menstruación. Este mecanismo de selección natural conlleva que la incidencia de gestaciones con alteraciones cromosómicas se vea reducida a medida que ésta avanza, siendo las alteraciones más letales (como las monosomías autosomales, tolerándose con mayor frecuencia un desequilibrio cromosómico por exceso que por defecto) raramente observadas y obteniéndose una tasa de anomalías cromosómicas en recién nacidos vivos (RNV) del 0,5% (Jacobs *et al.*, 1992) frente al más de 50% de

alteraciones que se observa en abortos del primer trimestre de gestación. Sin duda, este desequilibrio cromosómico conlleva un desequilibrio en la dosis génica cuyo grado o letalidad dependerá del tamaño de la alteración, el cromosoma o regiones cromosómicas implicadas y posiblemente de la alteración de fenómenos epigenéticos como consecuencia de éste (Heard y Bickmore, 2007). Siendo así, las alteraciones cromosómicas compatibles con la vida extrauterina u observadas en estadios más avanzados de la gestación (aquellas a descartar en un diagnóstico citogenético prenatal, principalmente aneuploidías de los cromosomas sexuales y trisomías de los cromosomas 13, 18 y 21) conllevan el menor desequilibrio genético (observar la densidad génica relativa de cada cromosoma en el anexo IV).

Se ha demostrado un incremento casi exponencial del riesgo de aneuploidías en gestaciones de mujeres por encima de los 35 años de edad (1 en 192), llegando incluso a triplicarse a los 40 años (1 en 66) (Hassold y Jacobs, 1984). Además, algunos estudios describen una mayor incidencia de gametos con alteraciones cromosómicas estructurales (pero no numéricas) en varones de edad avanzada (Martin y Rademaker, 1987), a la par que una elevada frecuencia de mutaciones *de novo* que portarían las células germinales, demostrada en el caso de mutaciones en los genes FGFR3 y FGFR2, causantes de displasias óseas (Wyrobek *et al.*, 2006). Sin embargo como ya discutimos anteriormente, el origen de las trisomías, hasta el momento mayor causa cromosómica descrita del aborto espontáneo, es materno y debido a errores (Hassold y Hunt, 2001) en la primera división meiótica en la mayoría de los casos.

Sin embargo, los resultados obtenidos mediante el empleo de nuevas técnicas de elevado poder de resolución (fundamentalmente array CGH) y los nuevos abordajes descritos en la literatura nos llevan a replantear la necesidad de reevaluar la incidencia de alteraciones cromosómicas -tradicionalmente estimada en base a los estudios citogenéticos- en abortos espontáneos y por qué no, en la población general.

Algunos estudios sugieren que la mayoría de los abortos en los cuales el cultivo celular fracasa presentan alguna alteración cromosómica (Fritz *et al.*, 2001a). Considerando que las anomalías cromosómicas puedan afectar a la proliferación celular y a los procesos de apoptosis durante la diferenciación de las vellosidades coriales (Qumsiyeh *et al.*, 2000), bien podría ésto extrapolarse al cultivo de este tipo de material *in vitro*. Sosteniendo esta hipótesis, Hassold y colaboradores ya apuntaban algo en 1980 observando diferencias significativas en el número de días requerido de cultivo para la obtención del cariotipo en función de la dotación cromosómica de éste (normal o desequilibrada). Sin embargo, la obtención de cariotipos anómalos podría hacer pensar que sólo aquellos más “letales” presentarían una mayor predisposición al fracaso en cultivo. No obstante, el fracaso del cultivo no sólo dependerá de la constitución cromosómica alterada del tejido a estudiar, sino lógicamente también de la cantidad y viabilidad del tejido a la hora de establecer el cultivo, condicionada por su propio estado de conservación,

de la correcta manipulación y condiciones de los medios y material de cultivo, o de la contaminación microbiana.

Otros autores han propuesto que el cultivo celular pueda dar lugar a su vez a falsos cariotipos normales o exclusivamente a aquellos anómalos que permitan la proliferación celular *in vitro* (Benkhalifa *et al.*, 2005). Con el propósito de validar esta hipótesis, procedieron a realizar un estudio mediante array CGH en el que se incluyeron 26 abortos espontáneos de 9 a 11 semanas de gestación en los que el cultivo celular había fracasado. Los resultados mostraron que 6 de los 15 abortos aneuploides presentaban 2 anomalías cromosómicas cada uno, apareciendo además la monosomía autosómica suprarrepresentada (en 5 de los 15 casos aneuploides) en comparación con las frecuencias de ésta reportadas en la literatura. Ésto llevaría a plantear la posibilidad de que las monosomías autosomales impidieran por lo general la proliferación celular *in vitro* (al menos en aquellos medios de cultivo comúnmente utilizados en el procesamiento de restos abortivos) o que pudieran dar lugar a falsos cariotipos normales mediante complementación de la monosomía por duplicación cromosómica, lo que se podría valorar estudiando isodisomías en abortos con cariotipo euploide. No obstante, Fritz y colaboradores (2001b) contemplan esta hipótesis estudiando UPD de todos los cromosomas en 71 abortos con cariotipo normal, encontrando un sólo caso (1,4%) de isodisomía, con lo que concluyen una baja incidencia de UPD en abortos del primer trimestre de gestación.

En un intento de valorar si las frecuencias de alteraciones cromosómicas obtenidas en el presente estudio (y en concreto, trisomías) son similares a las establecidas en la literatura en base a estudios citogenéticos, se presenta la comparación de éstas con las derivadas del ensayo de validación de MLPA para la detección de aneuploidías (figura 41). Lamentablemente, la falta de una muestra homogénea, convenientemente catalogada y lo suficientemente amplia como para poder obtener resultados estadísticamente significativos justifica el no poder establecer frecuencia alguna acerca de la incidencia y tipos de alteraciones cromosómicas en base a los resultados presentados en este estudio. Sin embargo, por otra parte, llama la atención la elevada frecuencia de monosomía autosómica reportada en el estudio de Benkhalifa y colaboradores (2005) puesto que a lo largo de toda nuestra colección de muestras, incluidos aquellos casos estudiados mediante MLPA en los que no se disponía de estudio citogenético, no se ha detectado ninguna alteración de este tipo.

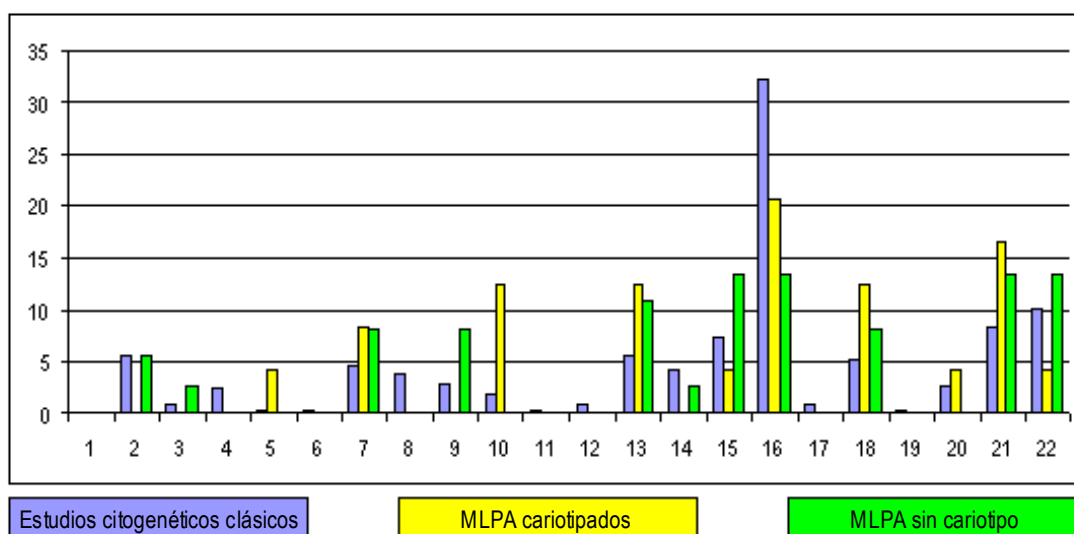


Figura 41. Comparación de las frecuencias relativas (eje *y*) de cada trisomía autosómica simple (eje *x*) en los estudios citogenéticos reportados en la literatura (*cian*, ver también figura 5, N=950), los abortos trisómicos cariotipados incluidos en el ensayo de validación de MLPA (*amarillo*, N=24) y aquellos trisómicos en los que no se contaba con estudio citogenético incluidos en el mismo ensayo (*verde*, N=37). A pesar de que el tamaño muestral de los tres conjuntos imposibilita el realizar un estudio estadísticamente coherente, sorprende la aparente similitud en la frecuencia con que aparece representada la trisomía 16 con respecto de las demás en nuestra muestra de abortos sin cariotipar, habiéndose descrito como la más frecuente en los estudios citogenéticos. Considerando las hipótesis anteriormente planteadas, podría asumirse que el caso concreto de esta trisomía resulte la menos desfavorable a la hora de que estas células proliferen *in vitro*, y no la más frecuente como hasta ahora se había pensado.

Por último, recientemente además se ha postulado que en torno a un 5% de los abortos con cariotipo normal presenten anomalías cromosómicas submicroscópicas detectables mediante técnicas moleculares (Shimokawa *et al.*, 2006).

Asumiendo las hipótesis anteriores y considerando la elevada tasa de fallo del cultivo celular, la incidencia de anomalías cromosómicas en abortos espontáneos sería superior a la establecida en base a los estudios citogenéticos. A lo largo de nuestra colección de muestras y empleando técnicas moleculares de elevado poder de resolución, se han observado alteraciones submicroscópicas tanto en las que contaban con cariotipo como en aquellas en las que éste no pudo ser establecido. Con lo que, de acuerdo a lo discutido anteriormente y a los resultados obtenidos en el presente y en otros estudios (Fritz *et al.*, 2001a; Schaeffer *et al.*, 2004; Benkhalifa *et al.*, 2005; Diego-Alvarez *et al.*, 2006; Shimokawa *et al.*, 2006), se considera conveniente reevaluar la tasa y tipos de alteraciones cromosómicas en abortos espontáneos.

Sin embargo, para reevaluar esta tasa de incidencias cromosómicas algunas consideraciones habrían de tenerse en cuenta, como contar con un elevado número de muestras perfectamente



catalogadas (edad gestacional, calidad de la muestra, tejido a estudiar, si se trata de tejido placentario o fetal y posibles causas del fracaso del cultivo en caso oportuno) y un protocolo estandarizado del procesamiento de las muestras que incluyese además del estudio citogenético (a ser posible de alta resolución), estudios moleculares mediante MLPA (estudio de regiones subteloméricas) y array CGH.

En cuanto al estudio de alteraciones cromosómicas en parejas con abortos de repetición, se ha demostrado que hasta un 9,2% de las parejas que sufre abortos de repetición alguno de los miembros presenta una alteración cromosómica equilibrada (de Braekeleer y Dao, 1990; Stern *et al.*, 1999; Franssen *et al.*, 2005). Sin embargo, en base a los hallazgos obtenidos, algunos estudios recientes sugieren que esta incidencia podría ser incluso aún mayor. Alkuraya y colaboradores (2006) reportan el caso de una paciente de 36 años de edad con tres abortos del primer trimestre en la cual su cariotipo resultó normal. El nacimiento de una niña con cariotipo desequilibrado llevó a reanalizar el cariotipo de ambos progenitores utilizando un kit comercial de FISH con sondas subteloméricas, encontrando en la madre una translocación submicroscópica entre los cromosomas 10 y 17, origen del reordenamiento desequilibrado en la niña y posiblemente, causa de los abortos previos. Por su parte, Cockwell y colaboradores (2003) estudiaron la presencia de este tipo de alteraciones subteloméricas crípticas en 50 parejas cromosómicamente normales remitidas por abortos de repetición, encontrando inesperadamente una frecuencia relativamente alta (5%) de portadores de alteraciones pericentroméricas en los cromosomas acrocéntricos. Los hallazgos descritos en estos dos estudios, deberían tenerse en cuenta además a la hora de reevaluar la incidencia de cromosomopatías en abortos espontáneos.

	Cariotipado	FISH	QF-PCR	MLPA*	CGH	1 Mb array CGH
Requerimientos de la muestra:						
Viabilidad celular	Necesaria	No necesaria <sup>a</sup>	No necesaria	No necesaria	No necesaria	No necesaria
Medio de transporte / conservación	Esterilidad, tejido fresco	Fresco	Independiente <sup>d</sup>	Independiente <sup>d</sup>	Independiente <sup>d</sup>	Independiente <sup>d</sup>
Anomalías numéricas:						
Aneuploidía	Detectable	Detectable	Detectable	Detectable	Detectable	Detectable
Triploidía	Detectable	Detectable	Detectable	No detectable	No detectable	No detectable <sup>c</sup>
Tetraploidía	Detectable	Detectable	No detectable <sup>d</sup>	No detectable	No detectable	No detectable
Mosaicismo cromosómico:	Detectable	Detectable	Detectable <sup>e</sup>	Detectable <sup>e</sup>	Detectable <sup>e</sup>	Detectable <sup>e</sup>
Anomalías estructurales:						
Translocaciones equilibradas	Detectables	Sondas dirigidas	No detectables	No detectables	No detectables	No detectables
Translocaciones desequilibradas	Detectables	Sondas dirigidas	Marcadores específicos e informativos	Detectables	Detectables	Detectables
Inversiones	Detectables	Sondas dirigidas	No detectables	No detectables	No detectables	No detectables
Duplicación segmentos cromosómicos	Detectable <sup>f</sup>	Sondas dirigidas	Marcadores específicos e informativos	Terminal	> 3 Mb	> 1 Mb
Delección segmentos cromosómicos	Detectable <sup>f</sup>	Sondas dirigidas	Marcadores específicos e informativos	Terminal	> 3 Mb	> 1 Mb
Anillos	Detectables	Sondas dirigidas <sup>g</sup>	No detectables	Detectables	Detectable	Detectables
Cromosomas marcadores	Detectables <sup>h</sup>	Sondas centroméricas	Detectables <sup>h</sup>	No detectables	No detectables	Detectables <sup>h</sup>
Molas hidatidiformes:	No detectables <sup>i</sup>	No detectables <sup>i</sup>	Detectables	No detectables	No detectables	No detectables
Disomía uniparental (UPD):	No determinable <sup>j</sup>	No detectable	Determinable	No detectable	No detectable	No detectable
Contaminación materna:	No detectable <sup>k</sup>	No detectable <sup>k</sup>	Detectable	No detectable	No detectable	No detectable
Origen de la anomalía:						
Parental	No determinable <sup>j</sup>	No determinable	Determinable	No determinable	No determinable	No determinable
Meiótico / mitótico	No determinable	No determinable	Determinable	No determinable	No determinable	No determinable
Resolución:	300-900 bandas; visualización de todos los cromosomas	Limitada y dirigida <sup>l</sup>	Limitada <sup>m</sup>	Regiones subteloméricas de todos los cromosomas	Genoma completo; > 3 Mb <sup>n</sup>	Genoma completo; > 1 Mb
Tiempo requerido:						
Procesamiento	2-4 semanas	24-48 h	< 24 h	24 h	72 h	72 h
Análisis resultados	Elevado	Moderado	Bajo	Moderado	Elevado	Moderado
Automatización:	No posible	No posible	Posible	Posible	No posible	No posible
Nº muestras procesadas por ensayo (máximo recomendado):	-----	6	96	15	4	6
Coste (reactivos, fungible):	Moderado	Alto	Bajo	Bajo	Alto	Caro
Aparataje específico requerido <sup>n</sup> :	Microscopio óptico	Microscopio fluorescencia	Termociclador, aparato de electroforesis capilar	Termociclador, aparato de electroforesis capilar	Microscopio fluorescencia	Nanodrop, scanner de fluorescencia

Tabla XVI. Comparación de distintas técnicas empleadas en el estudio cromosómico de abortos espontáneos. Especificaciones: \*Empleo de kits de sondas subteloméricas. *a*) FISH sobre núcleos en interfase (células no cultivadas); *b*) Preferiblemente en fresco o congelado, pero resultados aceptables en muestras fijadas durante un tiempo prudente en formol o incluso embebidas en parafina; *c*) Mediante el empleo de una línea celular aneuploide para la dotación cromosómica sexual como control (ver Ballif *et al.*, 2006b); *d*) No detectable si es causada por error de división del cigoto; sí por fertilización trispermica del óvulo; *e*) En función de la proporción de cada línea celular; *f*) Dependiendo de la resolución en bandas y el tamaño de la anomalía; *g*) Empleo de sondas subteloméricas (*Chromoprobe Multiprobe System*, Cytocell); *h*) Dependiendo del cromosoma marcador; mediante cariotipado, en algunos casos solamente se evidencia su presencia; mediante aCGH, se puede establecer además el origen de éste; mediante QF-PCR con marcadores dirigidos puede confirmarse su presencia; *i*) Las molas completas pasarían inadvertidas; en el caso de las parciales, no podría establecerse el origen parental de la triploidía; *j*) Salvo excepciones (heteromorfismos característicos en cromosomas parentales); *k*) Salvo que existan dos líneas celulares diferenciadas y se compruebe mediante análisis de marcadores microsatélites; *l*) Sondas específicas; multiplex de hasta cinco fluoróforos; inconveniente hibridación cruzada de algunas sondas centroméricas; *m*) Limitación del número máximo de marcadores por multiplex; *n*) Limitada en regiones (peri)centroméricas y (sub)teloméricas (secuencias repetidas); *n*) Cada aplicación requiere de al menos un programa de software específico.

## 6 – CONCLUSIONES

En base a lo anteriormente expuesto en la presente memoria, se establecen las siguientes conclusiones:

Primera: el correcto procesamiento y selección de la muestra son limitantes a la hora de obtener resultados en el estudio cromosómico de restos abortivos; las vellosidades coriales frente a otros tejidos constituyen el material de elección para este tipo de estudios debido a su mayor viabilidad y sencillo reconocimiento, evitando además el posible sesgo en la detección de trisomías que el estudio de otro tipo de tejidos -debido al rescate de la trisomía- podría suponer.

Segunda: el empleo de la técnica de QF-PCR en multiplex permite no sólo la detección de triploidía y aneuploidías más frecuentes en abortos espontáneos tanto completas como en mosaico, sino además descartar la presencia de contaminación materna en la muestra, establecer el origen de la alteración y servir como método diagnóstico complementario a los análisis histológicos en el caso de las molas hidatidiformes.

Tercera: se demuestra la posibilidad de que ocurran errores meióticos afectando a dos cromosomas distintos en diferentes divisiones (MI y MII) para dar lugar a un mismo gameto según el patrón más frecuente descrito para cada cromosoma, lo que sugiere que un mecanismo común, hasta el momento desconocido, podría operar en el caso de las simples y las dobles trisomías.

Cuarta: se confirman la utilidad y la fiabilidad de la técnica de MLPA con el empleo de kits de sondas subteloméricas (P036B y P070) para la detección de aneuploidías y reordenamientos terminales desequilibrados de todos los cromosomas en un mismo ensayo, con una tasa de fracaso de la técnica cercana al 2% y descartando la obtención de resultados falsos positivos y negativos, pero alarmando acerca de la posible presencia de polimorfismos en las secuencia diana de las sondas, lo cual podría suponer una dificultad en la interpretación de los resultados obtenidos en determinados casos.

Quinta: de acuerdo a los resultados preliminares de este trabajo y a los descritos en la literatura, se puede considerar que el empleo de la técnica de array CGH para el estudio de abortos podría contribuir a una mejor delimitación de determinadas anomalías cromosómicas y por tanto, suponer una mejor comprensión de los mecanismos de formación de éstas, así como en la detección de nuevas alteraciones submicroscópicas causantes de pérdidas fetales o embrionarias.

Sexta: dado que el empleo de técnicas moleculares ha permitido detectar alteraciones cromosómicas submicroscópicas, e incluso determinar un diagnóstico en algunos de aquellos casos en los que éste no pudo establecido mediante su estudio citogenético, el empleo conjunto de técnicas

moleculares y citogenéticas debe considerarse en el protocolo rutinario de estudio de alteraciones cromosómicas en abortos espontáneos según modelo propuesto en la presente memoria.

Séptima: se recomienda reevaluar la incidencia y tipos de alteraciones cromosómicas, tanto en abortos espontáneos como en parejas con problemas de reproducción, teniendo en cuenta las consideraciones expuestas en la presente memoria y en base a estudios que además de las técnicas citogenéticas clásicas, empleen técnicas moleculares de elevado poder de resolución.

## 7 – BIBLIOGRAFÍA

- Abel EL (1997) *Maternal alcohol consumption and spontaneous abortion*. Alcohol Alcohol 32(3):211-9.
- Adinolfi M, Pertl B, Sherlock J (1997) *Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction*. Prenat Diagn 17(13):1299-1311.
- Adinolfi M, Sherlock J, Cirigliano V, Pertl B (2000) *Prenatal screening for aneuploidies by quantitative fluorescent polymerase chain reaction*. Community Genet 3:50-60.
- Alkuraya FS, Martin CL, Kimonis VE (2006) *Recurrent miscarriage in a carrier of a balanced cytogenetically undetectable subtelomeric rearrangement: how many are we missing?* Prenat Diagn 26:291-5.
- Alonso A, Soto I, Urgelles M, Corte J, Rodriguez M, Pinto C (2002) *Acquired and inherited thrombophilia in women with unexplained fetal losses*. Am J Obstet Gynecol 187:1337-42.
- Anahory T, Hamamah S, Andreo B, Hedon B, Claustres M, Sarda P, Pellestor F (2005) *Sperm segregation analysis of a (13;22) Robertsonian translocation carrier by FISH: a comparison of locus-specific probe and whole chromosome painting*. Hum Reprod 20(7):1850-4.
- Ballif BC, Rorem EA, Sundin K, Lincicum M, Gaskin S, Coppinger J, Kashork CD, Shaffer LG, Bejjani BA (2006a) *Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens*. Am J Med Genet Part A 140(A):2757-67.
- Ballif BC, Kashork CD, Saleki R, Rorem E, Sundin K, Bejjani BA, Shaffer LG (2006b) *Detecting sex chromosome anomalies and common triploidies in products of conception by array-based comparative genomic hybridization*. Prenat Diagn 26(4):333-9.
- Bartels I, Franke U, Bräulke I, Rauskolb R, Raab-Vetter M (1997) *Normal outcome of a pregnancy with mosaicism for double trisomy in amniotic fluid cells*. Prenat Diagn 17(9):877-8.
- Bell KA, Van Deerlin PG, Haddad BR, Feinberg RF (1999a) *Cytogenetic diagnosis of "normal 46,XX" karyotypes in spontaneous abortions frequently may be misleading*. Fertil Steril 71(2):334-41.
- Bell KA, van Deerlin V, Addya K, Clevenger CV, van Deerlin PG, Leonard DG (1999b) *Molecular genetic testing from paraffin-embedded tissue distinguishes nonmolar hydropic abortion from hydatidiform mole*. Mol Diagn 4(1):11-9.

- Bell KA, Van Deerlin PG, Feinberg RF, du Manoir S, Haddad BR (2001) *Diagnosis of aneuploidy in archival, paraffin-embedded pregnancy-loss tissues by comparative genomic hybridization*. Fertil Steril 75 (2): 374-379.
- Benkhalifa M, Bonneau M, Popescu P, Boscher J, Boucher D, Malet P (1992) *A method for cytogenetic analysis of boar spermatozoa using hamster oocytes*. Ann Genet 35(1):61-4.
- Benkhalifa M, Kahraman S, Caserta D, Donmez E, Qumsiyeh MB (2003) *Morphological and cytogenetic analysis of intact oocytes and blocked zygotes*. Prenat Diagn 23:397-404.
- Benkhalifa M, Kahraman S, Biricik A, Serteyl S, Domez E, Kumtepe Y, Qumsiyeh MB (2004) *Cytogenetic abnormalities and the failure of development after round spermatid injections*. Fertil Steril 81(5):1283-8.
- Benkhalifa M, Kasakyan S, Clement P, Baldi M, Tachdjian G, Demirel A, Gurgan T, Fiorentino F, Mohammed M, Qumsiyeh MB (2005) *Array comparative genomic hybridization profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro*. Prenat Diagn 25(10):894-900.
- Bond DJ, Chandley AC (1983) *The origin and causes of aneuploidy in man*. En: *Aneuploidy*. Oxford Monographs on Medical Genetics (Oxford Medical Publications), pp.10-14. NY.
- Boue J, Boue A, Lazar P (1975) *Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions*. Teratology 12(1):11-26.
- Bruno DL, Burgess T, Ren H, Nouri S, Pertile MD, Francis DI, Norris F, Kenney BK, Schouten J, Choo KHA, Slater HR (2006) *High-throughput analysis of chromosome abnormality in spontaneous miscarriage using an MLPA subtelomere assay with an ancillary FISH test for polyploidy*. Am J Med Genet Part A 140A:2786-93.
- Bugge M, Collins A, Petersen MB, Fisher J, Brandt C, Hertz JM, Tranebjaerg L, de Lozier-Blanchet C, Nicolaides P, Brondum-Nielsen K, Morton N, Mikkelsen M (1998) *Non-disjunction of chromosome 18*. Hum Mol Genet 7(4):661-9.
- Carp H, Toder V, Aviram A, Daniely M, Mashiach S, Barkai G (2001) *Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage*. Fertil Steril 75(4):678-682.
- Carr DH (1963) *Chromosome studies in abortuses and stillborn infants*. Lancet 15:603-6.



- Chakravarti A, Slaugenhaupt SA (1987) *Methods for studying recombination on chromosomes that undergo nondisjunction*. Genomics 1(1):35-42.
- Chakravarti A (1989) *The probability of detecting the origin of nondisjunction of autosomal trisomies*. Am J Hum Genet 44(5):639-45.
- Cirigliano V, Sherlock J, Conway G, Quilter C, Rodeck C, Adinolfi M (1999) *Rapid detection of chromosomes X and Y aneuploidies by quantitative fluorescent PCR*. Prenat Diagn 19(12):1099-1103.
- Cirigliano V, Ejarque M, Cañadas MP, Lloveras E, Plaja A, Perez MM, Fuster C, Egozcue J (2001) *Clinical application of multiplex QF-PCR for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies*. Molec Hum Reprod 7(10):1001-6.
- Cirigliano V, Voglino G, Cañadas MP, Marongiu A, Ejarque M, Ordoñez E, Plaja A, Massobrio M, Todros T, Fuster C, Campogrande M, Egozcue J, Adinolfi M (2004) *Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18000 consecutive clinical samples*. Molec Hum Reprod 10(11):839-46.
- Cockwell AE, Jacobs PA, Beal SJ, Crolla JA (2003) *A study of cryptic terminal chromosome rearrangements in recurrent miscarriage couples detects unsuspected acrocentric pericentromeric abnormalities*. Hum Genet 112:298-302.
- Collodel G, Moretti E, Capitani S, Piomboni P, Anichini C, Estenoz M, Baccetti B (2006) *TEM, FISH and molecular studies in infertile men with preicentric inversion of chromosome 9*. Andrologia 38(4):122-7.
- Cousineau TM, Domar AD (2007) *Psychological impact of infertility*. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology 21(2):293-308.
- Creasy MR, Crolla JA, Alberman ED (1976) *A cytogenetic study of human spontaneous abortions using banding techniques*. Hum Genet 31(2):177-96.
- Daniely M, Aviram-Goldring A, Barkai G, Goldman B (1998) *Detection of chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization*. Hum Reprod 13(4):805-9.

- Daniely M, Barkai B, Goldman B, Aviram-Goldring A (1999) *Detection of numerical chromosome aberrations by comparative genomic hybridization*. Prenat Diagn 19:100-4.
- de Braekeleer M, Dao TN (1990) *Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses*. Hum Reprod 5(5):519-28.
- de la Rochebrochard E, Thonneau P (2002) *Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study*. Hum Reprod 17(6):1649-56.
- Diego-Alvarez D, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, Gonzalez-Gonzalez C, Rodriguez de Alba M, Ayuso C, Ramos-Corrales C, Lorda-Sanchez I (2005) *Application of quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages*. Hum Reprod 20(5):1235-43.
- Diego-Alvarez D, Ramos-Corrales C, Garcia-Hoyos M, Bustamante-Aragones A, Cantalapiedra D, Diaz-Recasens J, Vallespin-Garcia E, Ayuso C, Lorda-Sanchez I (2006) *Double trisomy in spontaneous miscarriages: cytogenetic and molecular approach*. Hum Reprod 21(4):958-66.
- Diego-Alvarez D, Rodriguez de Alba M, Cardero-Merlo R, Diaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C, Lorda-Sanchez I (2007) *MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages*. Prenat Diagn 27:765-71.
- Dilley A, Benito C, Hooper WC, Austin H, Miller C, El-Jamil M, Cottrell S, Benson J, Evatt BL, Patterson-Bamett A, Eller D, Philipp C (2002) *Mutations in the factor V, prothombin and MTHFR genes are not risk factors for recurrent fetal loss*. J Matern Fetal Neonatal Med 11(3):176-82.
- Dominguez-Rojas V, de Juanes-Pardo JR, Astasio-Arbiza P, Ortega-Molina P, Gordillo-Florencio E (1994) *Spontaneous abortion in a hospital population: are tobacco and coffee intake risk factors?* Eur J Epidemiol 10:665-8.
- Donaghue C, Mann K, Docherty Z, Ogilvie CM (2005) *Detection of mosaicism for primar trisomies in prenatal samples by QF-PCR and karyotype analysis*. Prenat Diagn 25(1):65-72.
- Eggermann T, Nothen MM, Eiben B, Hofmann D, Hinkel K, Fimmers R, Schwanitz G (1996) *Trisomy of human chromosome 18: molecular studies on parental origin and cell stage of nondisjunction*. Hum Genet 97(2):218-23.

- Erdogan F, Ullmann R, Chen W, Schubert M, Adolph S, Hultschig C, Kalscheuer V, Ropers HH, Spaich C, Tzschach A (2007) *Characterization of a 5.3 Mb deletion in 15q14 by comparative genomic hybridization using a whole genome "tiling path" BAC array in a girl with heart defect, cleft palate, and developmental delay*. Am J Med Genet A 143(2):172-8.
- Ezpeleta JM, Cousillas AL (2002) *Enfermedad trofoblástica gestacional: aspectos clínicos y morfológicos*. Rev Esp Patol 35(2):187-200.
- Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, Scott CE, Smith J, Vetrie D, Goorman P, Tomlinson IP, Carter NP (2003) *DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones*. Genes Chromosomes Cancer 36(4):361-74.
- Finan R, Tamim H, Ameen G, Sharida H, Rashid M, Almawi W (2002) *Prevalence of factor V G1691A (factor V-Leiden) and prothrombin G20210A gene mutations in a recurrent miscarriage population*. Am J Hematol 71:300-5.
- Fisher JM, Harvey JF, Morton NE, Jacobs PA (1995) *Trisomy 18: studies of the parent and cell division of origin and the effect of aberrant recombination on nondisjunction*. Am J Hum Genet 56(3):669-75.
- Forti G, Krausz C (1998) *Evaluation and treatment of the infertile couple*. J Clin Endocrinol Metab 83(12):4177-88.
- Franssen MTM, Korevaar JC, Leschot NJ, Bossuyt PMM, Knecht AC, Gerssen-Schoorl KBJ, Wouters CH, Hansson KBM, Hochstenbach R, Madan K, van der Veen F, Goddijn M (2005) *Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages*. BMJ 331:137-41.
- Fritz B, Hallermann C, Olert J, Fuchs B, Bruns M, Aslan M, Schmidt S, Coerdts W, Muntefering H, Rehder H (2001a) *Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH)-Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions*. Eur J Hum Genet 9(7):539-47.
- Fritz B, Aslan M, Kalscheuer V, Ramsing M, Saar K, Fuchs B, Rehder H (2001b) *Low incidence of UPD in spontaneous abortions beyond the 5th gestational week*. Eur J Hum Genet 9 (12):910-6.
- García Enguídanos A (1999) *Factores de riesgo en el aborto espontáneo*. Tesis doctoral. UAM, Facultad de Medicina.

- Gerdes T, Kirchhoff M, Lind AM, Larsen GV, Schwartz M, Lundsteen C (2005) *Computer-assisted prenatal aneuploidy screening for chromosome 13, 18, 21, X and Y based on multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)*. Eur J Hum Genet 13(2):171-5.
- Greenland S, Richwald GA, Honda GD (1983) *The effects of marijuana use during pregnancy: a study in a low risk home delivery population*. Drug Alcohol Depend 11:359.
- Greenwold N, Jauniaux E (2002) *Collection of villous tissue under ultrasound guidance to improve the cytogenetic study of early pregnancy failure*. Hum Reprod 17:452-6.
- Griebel CP, Halvorsen J, Golemon T, Day AA (2005) *Management of spontaneous abortion*. American Family Physician 72(7):1243-9.
- Gueneri S, Bettio D, Simoni G, Brambati B, Lanzani A, Fraccaro M (1987) *Prevalence and distribution of chromosome abnormalities in a sample of first trimester internal abortions*. Hum Reprod 2(8):735-9.
- Harlap S, Shiono PH (1980) *Alcohol, smoking, and incidence of spontaneous abortion in the first and second trimester*. Lancet 2:173-6.
- Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, Matsuyama A, Wilson C, Yamane JA, Jacobs PA (1980) *A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions*. Ann Hum Genet 44 (Pt 2):151-178.
- Hassold TJ, Jacobs PA (1984) *Trisomy in man*. Annu Rev Genet 18:69-97.
- Hassold T, Chiu D (1985) *Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy*. Hum Genet 70(1):11-7.
- Hassold T, Merrill M, Adkins K, Freeman S, Sherman S (1995) *Recombination and maternal age-dependent nondisjunction: molecular studies of trisomy 16*. Am J Hum Genet 57(4):867-74.
- Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, Saker D, Shen J, Zaragoza M (1996) *Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology*. Environ Mol Mutagen 28(3):167-75.
- Hassold T, Hunt P (2001) *To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy*. Nat Rev Genet 2(4):280-91.

- Hatasaka HH (1994) *Recurrent miscarriage: epidemiologic factors, definitions, and incidence*. Clin Obstet Gynecol 37(3):625-34.
- Heard E, Bickmore W (2007) *The ins and outs of gene regulation and chromosome territory organisation*. Current Opinion in Cell Biology 19:311-6.
- Hochstenbach R, Meijer J, van de Brug J, Vossebeld-Hoff I, Jansen R, van der Lijst RB, Sinke RJ, Page-Christiaens GC, Ploos van Amstel JK, de Pater JM (2005) *Rapid detection of chromosomal aneuploidies in uncultured amniocytes by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)*. Prenat Diagn 25(11):1032-9.
- Hulten MA, Dhanjal S, Pertl B (2003) *Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR*. Reproduction 126(3):279-297.
- Jacobs PA, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H (1992) *Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding*. J Med Genet 29:103-8.
- Jobanputra V, Sobrino A, Kinney A, Kline J, Warburton D (2002) *Multiplex interphase FISH as a screen for common aneuploidies in spontaneous abortions*. Hum Reprod 17(5):1166-70.
- Johnson MP, Drugan A, Koppitch FC 3<sup>rd</sup>, Uhlmann WR, Evans MI (1990) *Postmortem chorionic villus sampling is a better method for cytogenetic evaluation of early fetal loss than culture of abortus material*. Am J Obstet Gynecol 163(5Pt1):1505-10.
- Kahraman S, Benkhalifa M, Donmez E, Biricik A, Sertyel S, Findikli N, Berkil H (2004) *The results of aneuploidy screening in 276 couples undergoing assisted reproductive techniques*. Prenat Diagn 24(4):307-11.
- Kajii T, Ferrier A, Niikawa N, Takahara H, Ohama K, Avirachan S (1980) *Anatomic and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses*. Hum Genet 55(1):87-98.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992) *Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors*. Science 258(5083):818-21.
- Kalousek DK (1994) *Confined placental mosaicism and uniparental disomy*. Funct Dev Morphol 4(2):93-8.

- Kleinhaus K, Perrin M, Friedlander Y, Paltiel O, Malaspina D, Harlap S (2006) *Paternal age and spontaneous abortion*. *Obstet Gynecol* 108:369-77.
- Kline J, Stein Z, Susser M, Warburton D (1977) *Smoking: a risk factor for spontaneous abortion*. *New Engl J Med* 297(15):796-3.
- Koehler KE, Hawley RS, Sherman S, Hassold T (1996) *Recombination and nondisjunction in humans and flies*. *Hum Mol Genet* 5 Spec No,1495-504.
- Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merx GF, Knoers NV, Kets M, Vermeer S, van Ravenswaaij CM, de Kovel CG, Brunner HG, Smeets D, de Vries BB, Sistermans EA (2004) *Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA)*. *J Med Genet* 41(12):892-9.
- Lanasa MC, Hogge WA, Kubik C, Blancato J, Hoffman EP (1999) *Highly skewed X-chromosome inactivation is associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion*. *Am J Hum Genet* 65(1):252-4.
- Lauritsen JG, Jonasson J, Therkelsen AJ, Lass F, Lindsten J, Petersen GB (1972) *Studies on spontaneous abortions. Fluorescence analysis of abnormal karyotypes*. *Hereditas* 71(1):160-3.
- Lebedev IN, Ostroverkhova NV, Nikitina TV, Sukhanova NN, Nazarenko SA (2004) *Features of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis*. *Eur J Hum Genet* 12:513-20.
- Le Caignec C, Boceno M, Saugier-veber P, Jacquemont S, Joubert M, David A, Frebourg T, Rival JM (2005) *Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations*. *J Med Genet* 42:121-8.
- Linn S, Schoenbaum SC, Monson RR, Rosner B, Strubblefield PG, Ryan KJ (1982) *No association between coffee consumption and adverse outcomes of pregnancy*. *N Engl J Med* 306:141-5.
- Linn S, Schoenbaum SC, Monson RR, Rosner R, Stubblefield PC, Ryan KJ (1983) *The association of marijuana use with outcome of pregnancy*. *Am J Public Health* 73:1161.

- Lomax B, Tang S, Separovic E, Phillips D, Hillard E, Thomson T, Kalousek DK (2000) *Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions*. Am J Hum Genet 66(5):1516-21.
- Lorda-Sanchez I, Binkert F, Maechler M, Robinson WP, Schinzel AA (1992) *Reduced recombination and paternal age effect in Klinefelter syndrome*. Hum Genet 89(5):524-30.
- Lorda-Sanchez I, Diego-Alvarez D, Ayuso C, Rodriguez de Alba M, Trujillo MJ, Ramos C (2005) *Trisomy 2 due to a 3:1 segregation in an abortion studied by QF-PCR and CGH*. Prenat Diagn 25:934-8.
- Maas NM, van Buggenhout G, Hannes F, Thienpont B, Sanlaville D, Kok K, Midro A, Andrieux J, Anderlid BM, Schoumans J, Hordijk R, Devriendt K, Fryns JP, Vermeesch J (2007) *Genotype-phenotype correlation in 21 patients with Wolf-Hirschhorn syndrome using high-resolution array CGH*. J Med Genet Sep 14 [Epub ahead of print].
- Makino T (2002) *Recurrent reproductive wastage and immunologic factors*. Am J Reprod Immunol 48:266-8.
- Mansfield ES (1993) *Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms*. Hum Mol Genet 2(1):43-50.
- Martin RH, Rademaker AW (1987) *The effect of age on the frequency of sperm chromosomal abnormalities in normal men*. Am J Hum Genet 41(3):484-92.
- Matalon ST, Blank M, Ornoy A, Shoenfeld Y (2001) *The association between anti-thyroid antibodies and pregnancy loss*. Am J Reprod Immunol 45(2):72-7.
- Menasha J, Levy B, Hirschhorn K, Kardon NB (2005) *Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from a 12-year study*. Genet Med 7(4):251-63.
- Menitskii IuL (1963) *Aberrant karyotypes in tissue cells of aborted fetus*. Vestn Akad Med Nauk SSSR 18:22-5.
- Miklos GLG, John B (1979) *Heterochromatin and satellite DNA in man: properties and prospects*. Am J Hum Genet 31:264-80.

- Miller JF, Williamson E, Glue J, Gordon YB, Grudzinskas JG, Sykes A (1980) *Fetal loss after implantation. A prospective study*. Lancet 13;2(8194):554-6.
- Mills JL, Holmes LB, Aarons JH, Simpson JL, Brown ZA, Jovanovis-Peterson LG, Conley MR, Graubard BI, Knopp RH, Metzger BE (1993) *Moderate caffeine use and the risk of spontaneous abortion and intrauterine growth retardation*. JAMA 269:593-7.
- Moore CM, Best RG (2001) *Chromosomal genetic disease: structural aberrations*. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group. pp.1-7.
- Moradkhani K, Puechberty J, Bhatt S, Vago P, Janny L, Lefort G, Hamamah S, Sarda P, Pellestor F (2006) *Meiotic segregation of rare Robertsonian translocations: sperm analysis of three t(14q;22q) cases*. Hum Reprod 21(5):1166-71.
- Morikawa M, Yamada H, Kato EH, Shimada S, Yamada T, Minakami H (2004) *Embryo loss pattern is predominant in miscarriages with normal chromosome karyotype among women with repeated miscarriage*. Hum Reprod 19(11):2644-7.
- Nacheva EP, Grace CD, Bittner M, Ledbetter DH, Jenkins RB, Green AR (1998) *Comparative genomic hybridization: a comparison with molecular and cytogenetic analysis*. Cancer Genet Cytogenet 100(2):93-105.
- Nagaishi M, Yamamoto T, Iinuma K, Shimomura K, Berend SA, Knops J (2004) *Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan*. J Obstet Gynaecol Res 30(3):237-41.
- Nelson D, Ness R, Grisso J, Cushman M (2002) *Sex hormones, hemostasis and early pregnancy loss*. Arch Gynecol Obstet 267:7-10.
- Nicolaidis P, Petersen MB (1998) *Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies*. Hum Reprod 13(2):313-9.
- Nikcevic AV, Tunkel SA, Nicolaides KH (1998) *Psychological outcomes following missed abortions and provision of follow-up care*. Ultrasound Obstet Gynecol 11:123-8.
- Nikcevic AV, Tunkel SA, Kuczmierczyk AR, Nicolaides KH (1999) *Investigation of the cause of miscarriage and its influence on women's psychological distress*. Br J Obstet Gynaecol 106(8):808-13.



- Oakeshott P, Hay P, Hay S, Steinke F, Rink E, Kerry S (2002) *Association between bacterial vaginosis or chlamydial infection and miscarriage before 16 weeks' gestation: prospective community based cohort study*. BMJ 325:1334.
- Ogasawara M, Aoki K, Okada S, Suzumori K (2000) *Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages*. Fertil Steril 73(2):300-4.
- Ogur G, van Assche E, Vegetti W, Verheyen G, Tournaye H, Bonduelle M, van Steirteghem A, Liebaers I (2006) *Chromosomal segregation in spermatozoa of 14 Robertsonian translocation carriers*. Mol Hum Reprod 12(3):209-15.
- Ohno M, Maeda T, Matsunobu A (1991) *A cytogenetic study of spontaneous abortions with direct analysis of chorionic villi*. Obstet Gynecol 77(3):394-8.
- Ozcan T, Burki N, Parkash V, Huang X, Pejovic T, Mahoney MJ, Ward DC (2000) *Cytogenetical diagnosis in paraffin-embedded fetoplacental tissue using comparative genomic hybridization*. Prenat Diagn 20:41-4.
- Palomares M, Delicado A, Lapunzina P, Arjona D, Aminosos C, Arcas J, Martinez Bermejo A, Fernandez L, Lopez Pajares I (2006) *MLPA vs multiprobe FISH: comparison of two methods for the screening of subtelomeric rearrangements in 50 patients with idiopathic mental retardation*. Clin Genet 69(3):228-33.
- Parazzini F, Chatenoud L, di Cintio E, Mezzopane R, Surace M, Zanconato G, Fedele L, Benzi G (1998) *Coffee consumption and risk of hospitalized miscarriage before 12 weeks of gestation*. Hum Reprod 13(8):2286-91.
- Penrose LS, Delhanty JD (1961) *Triploid cell cultures from a macerated foetus*. Lancet 1:1261-2.
- Pertl B, Kopp S, Kroisel PM, Hausler M, Sherlock J, Winter R, Adinolfi M (1997) *Quantitative fluorescence polymerase chain reaction for the rapid prenatal detection of common aneuploidies and fetal sex*. Am J Obstet Gynecol 177(4):899-906.
- Pertl B, Kopp S, Kroisel PM, Tului L, Brambati B, Adinolfi M (1999a) *Rapid detection of chromosome aneuploidies by quantitative fluorescence PCR: first application on 247 chorionic villus samples*. J Med Genet 36 (4), 300-303.

- Pertl B, Pieber D, Lercher-Hartlieb A, Orescovic I, Haeusler M, Winter R, Kroisel P, Adinolfi M (1999b) *Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy by quantitative fluorescent PCR on fetal samples from mothers at high risk for chromosome disorders*. *Molec Hum Reprod* 5(12):1176-9.
- Petignat P, Billieux MH, Blouin JL, Dahoun S, Vassilakos P (2003) *Is genetic analysis useful in the routine management of hydatidiform mole?* *Hum Reprod* 18(2):243-9.
- Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG (1998) *High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays*. *Nat Genet* 20(2):207-11.
- Plaza FJ, Diego-Alvarez D, Uriel M, Cañamares M, Calleja J, Rodriguez de Alba M, Ramos C (2007) *Diagnóstico prenatal de trisomía 9 en mosaico en el segundo trimestre de la gestación*. *Progresos en Obstetricia y Ginecología (en prensa)*.
- Qumsiyeh MB (1998) *Chromosome abnormalities in the placenta and spontaneous abortions*. *J Matern Fetal Med* 7:210-2.
- Qumsiyeh MB, Kim KR, Bradford W (2000) *Cytogenetics and mechanisms of spontaneous abortions: increased apoptosis and decreased cellular proliferation in chromosomally abnormal villi*. *Cytogenet Cell Genet* 88:230-5.
- Rai R, Regan L (2006) *Recurrent miscarriage*. *Lancet* 368:601-11.
- Ramos Corrales C (1988) *Repercusión de las translocaciones cromosómicas humanas*. Tesis doctoral. UCM, Facultad de Biología.
- Rasch V (2003) *Cigarette, alcohol, and caffeine consumption: risk factors for spontaneous abortion*. *Acta Obstet Gynecol Scand* 82(2):182-8.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shaperro MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME (2006) *Global variation in copy number in the human genome*. *Nature* 444(7118):444-54.

- Risch HA, Weiss NS, Clarke EA, Miller AB (1988) *Risk factors for spontaneous abortion and its recurrence*. Am J Epidemiol 128(2):420-30.
- Robinson WP, Bernasconi F, Mutirangura A, Ledbetter DH, Langlois S, Malcolm S, Morris MA, Schinzel AA (1993) *Nondisjunction of chromosome 15: origin and recombination*. Am J Hum Genet 53 (3), 740-751.
- Robinson WP, Barrett IJ, Bernard L, Telenius A, Bernasconi F, Wilson RD, Best RG, Howard-Peebles PN, Langlois S, Kalousek DK (1997) *Meiotic origin of trisomy in confined placental mosaicism is correlated with presence of uniparental disomy, high levels of trisomy in trophoblast, and increased risk of fetal intrauterine growth restriction*. Am J Hum Genet 60:917-27.
- Robinson WP, Bernasconi F, Lau A, McFadden DE (1999) *Frequency of meiotic trisomy depends on involved chromosome and mode of ascertainment*. Am J Med Genet 84(1):34-42.
- Romer T, Bojahr B, Muller J, Lober R (1996) *Early diagnosis of congenital and acquired intrauterine causes of abortion by post-abortion hysteroscopy*. Geburtshilfe Frauenheilkd 56:542-5.
- Rubio C, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohi J, Pellicer A (2003) *Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples*. Hum Reprod 18(1):182-8.
- Sanchez JM, Franzi L, Collia F, De Diaz SL, Panal M, Dubner M (1999) *Cytogenetic study of spontaneous abortions by transabdominal villus sampling and direct analysis of villi*. Prenat Diagn 19(7):601-3.
- Sandhal B (1989) *Smoking habits and spontaneous abortion*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 31:23-31.
- Santalo J, Catala V, Badenas J (1987) *Chromosomal abnormalities and IVF*. En: Egozcue J ed. *Cellular aspects of in vitro fertilization*. Cell Biology reviews. Leiola, Springer International, pp.63-72.
- Sarig G, Younis J, Hoffman R, Lanir N, Blumenfeld Z, Brenner R (2002) *Trombophilia is common in women with idiopathic pregnancy loss and is associated with late pregnancy wastage*. Fertil Steril 77(2):342-7.
- Schaeffer AJ, Chung J, Heretis K, Wong A, Ledbetter DH, Lese Martin C (2004) *Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages*. Am J Hum Genet 74(6):1168-74.

- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G (2002) *Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification*. Nucleic Acids Res 30(12):e57.
- Shaffer LG, Tommerup N (eds.) (2005) *ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. S. Karger, Basel.
- Shaffer LG (2006) *Risk estimates for uniparental disomy following prenatal detection of a nonhomologous Robertsonian translocation*. Prenat Diagn 26:303-7.
- Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H, Griffin DK (2003) *The genetic basis of infertility*. Reproduction 126:13-25.
- Shimokawa O, Harada N, Miyake N, Satoh K, Mizuguchi T, Niikawa N, Matsumoto N (2006) *Array comparative genomic hybridization analysis in first-trimester spontaneous abortions with "normal" karyotypes*. Am J Med Genet Part A 140(A):1931-5.
- Sierra S, Stephenson M (2006) *Genetics of recurrent pregnancy loss*. Seminars in Reproductive Medicine 24(1):17-24.
- Silvestre E, Cusi V, Antich J, Caballín MR (2002) *Protocolo para el estudio citogenético de los abortos espontáneos*. Prog Diag Prenat 14(4):146-151.
- Slama R, Bouyer J, Windham G, Fenster L, Werwatz A, Swan SH (2005) *Influence of paternal age on the risk of spontaneous abortion*. Am J Epidemiol 161(9):816-23.
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P (1997) *Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances*. Genes Chromosomes Cancer 20(4):399-407.
- Stephenson MD (1996) *Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples*. Fertil Steril 66(1):24-9.
- Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP (2002) *Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study*. Hum Reprod 17(2):446-451.

- Stern C, Pertile M, Norris H, Hale L, Baker HWG (1999) *Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure*. Hum Reprod 14(8):2097-101.
- Stirrat GM (1990a) *Recurrent miscarriage I: definition and epidemiology*. Lancet 336:673-5.
- Stirrat GM (1990b) *Recurrent miscarriage II: clinical associations, causes, and management*. Lancet 336:728-33.
- Strom CM, Ginsberg N, Applebaum M, Bozorgi N, White M, Caffarelli M, Verlinsky Y (1992) *Analyses of 95 first-trimester spontaneous abortions by chorionic villus sampling and karyotype*. J Assist Reprod Genet 9(5):458-61.
- Tabet AC, Aboura A, Dauge MC, Audibert F, Coulomb A, Batallan A, Couturier-Turpin MH, Feldmann G, Tachdjian G (2001) *Cytogenetic analysis of trophoblasts by comparative genomic hybridization in embryo-fetal development anomalies*. Prenat Diagn 21(8):613-8.
- Takahashi H, Ikarashi T, Kanazawa K, Kominami R, Tanaka K (1991) *Re-evaluation of hydatidiform mole by DNA fingerprint method: the discrepancy in the diagnoses by pathological finding and the DNA fingerprint method*. Placenta 12(5):487-93.
- Tavormina PL, Shiang R, Thomson LM, Zhu YZ, Wilkin DJ, Lachman RS, Wilcox WR, Rimoin DL, Cohn DH, Wasmuth JJ (1995) *Thanatophoric dysplasia (types I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3*. Nat Genet 9(3):321-8.
- Therkelsen AJ, Grunnet N, Hjort T, Myhre Jensen O, Jonasson J, Lauritsen JG, Lindsten J, Bruun Petersen G (1973) *Studies on spontaneous abortions*. En: *Chromosomal errors in relation to reproductive failure* (ed. A Boue y C Thibault), pp.81-94. INSERM, Paris.
- Tincani A, Balestrieri G, Danieli E, Faden D, Lojcono A, Acaia B, Trespidi L, Ventura D, Meroni PL (2003) *Pregnancy complications of the antiphospholipid syndrome*. Autoimmunity 36(1):27-32.
- Tijio JH, Levan A (1956) *The chromosome number of man*. Hereditas 42:1-6.
- Uehara S, Akai Y, Takeyama Y, Takabayashi T, Okamura K, Yajima A (1992) *Pericentric inversion of chromosome 9 in prenatal diagnosis and infertility*. Tohoku J Exp Med 166:417-27.

- Uehara S, Hashiyada M, Sato K, Sato Y, Fujimori K, Okamura K (2001) *Preferential X-chromosome inactivation in women with idiopathic recurrent pregnancy loss*. Fertil Steril 76(5):908-14.
- Ugwumadu A (2002) *Bacterial vaginosis in pregnancy*. Curr Opin Obstet Gynecol 14:115-8.
- Vaquero E, Lazzarin N, de Carolis C, Valensise H, Moretti C, Ramanini C (2000) *Mild thyroid abnormalities and recurrent spontaneous abortion: diagnostic and therapeutical approach*. Am J Reprod Immunol 43(4):204-8.
- Vermeesch JR, Baten E, Fryns JP, Devriendt K (2002) *Ring syndrome caused by ring chromosome 7 without loss of subtelomeric sequences*. Clin Genet 62(5):415-7.
- Vermeesch JR, Melotte C, Froyen G, van Vooren S, Dutta B, Maas N, Vermeulen S, Menten B, Speleman F, de Moor B, van Hummelen P, Marynen P, Fryns JP, Devriendt K (2005) *Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis*. J Histochem Cytochem 53(3):413-22.
- Vorsanova SG, Kolotii AD, Iourov IY, Monakhov VV, Kirillova EA, Soloviev IV, Yurov YB (2005) *Evidence for high frequency of chromosomal mosaicism in spontaneous abortions revealed by interphase FISH analysis*. J Histochem Cytochem 53(3):375-80.
- Warburton D, Fraser FC (1964) *Spontaneous abortion risks in man: data from reproductive histories collected in a medical genetics unit*. Am J Hum Genet 16:1-25.
- Warburton D, Stein Z, Kline J, Susser M (1980) *Chromosome abnormalities in spontaneous abortion: data from the New York City study*. En: Porter IH, Hook EB eds. *Human embryonic and fetal death*. New York, Academic Press: 261-87.
- Warburton D, Byrne J, Canki N (1991) *Chromosome anomalies and prenatal development: an atlas*. Oxf Monogr Med Genet 21, pp. 57-100.
- Warburton D, Dallaire L, Thangavelu M, Ross L, Levin B, Kline J (2004) *Trisomy recurrence: a reconsideration based on North American data*. Am J Hum Genet 75:376-85.
- Watkinson B, Fried PA (1985) *Maternal caffeine use before, during and after pregnancy and effects upon offspring*. Neurobehav Toxicol Teratol 7:9-17.

Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG, Nisula BC (1988) *Incidence of early loss of pregnancy*. N Engl J Med 319(4):189-94.

Windham GC, von Behren J, Fenster L, Schaeffer C, Swan SH (1997) *Moderate maternal alcohol consumption and risk of spontaneous abortion*. Epidemiology 8:509-14.

World Medical Organization (1996) *Declaration of Helsinki 1964*. BMJ 313(7070):1448-9.

Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, Glaser RL, Pearson FS, Evenson D (2006) *Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm*. Proc Natl Acad Sci USA 103(25):9601-6.

Yakut T, Ercelen N, Acar H, Kimya Y, Egeli U (2006) *Meiotic segregation analysis of reciprocal translocations both in sperms and blastomeres*. Am J Med Genet Part A 140(A):1074-82.

Yver M, Carles D, Bloch B, Bioulac-Sage P, Martin Negrier ML (2004) *Determination of DNA ploidy by fluorescence in situ hybridization (FISH) in hydatidiform moles: evaluation of FISH on isolated nuclei*. Hum Pathol 35(6):752-8.

Zaragoza MV, Jacobs PA, James RS, Rogan P, Sherman S, Hassold T (1994) *Nondisjunction of human acrocentric chromosomes: studies of 432 trisomic fetuses and liveborns*. Hum Genet 94(4):411-7.

ANEXOS



ANEXO I

***"Diagnosis of common aneuploidies in spontaneous miscarriages by QF-PCR with STR markers"***

Diego-Alvarez D, Lorda-Sanchez I, Trujillo-Tiebas MJ, Gonzalez-Gonzalez C, Garcia-Hoyos M, Martinez-Gonzalez V, Infantes F, Ramos C, Ayuso C. *European Human Genetics Conference 2004.*

***"Double trisomy in spontaneous abortions"***

Lorda-Sanchez I, Diego-Alvarez D, Diaz-Recasens J, Rodriguez de Alba M, Trujillo-Tiebas MJ, Garcia-Arevalo R, Cardero-Merlo R, Ramos C. *European Human Genetics Conference 2004.*

***"Molecular study of miscarriages with unbalanced reciprocal translocations"***

Diego-Alvarez D, Bustamante-Aragones A, Rodriguez de Alba M, Cardero-Merlo R, Ayuso C, Diaz-Recasens J, Ramos C, Lorda-Sanchez I. *European Human Genetics Conference 2005.*

***"Heterozygosity of eight STR markers studied by QF-PCR in spanish population"***

Bustamante-Aragones A, Lazaro M, Garcia-Hoyos M, Diego-Alvarez D, Cardero-Merlo R, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C, Ramos C. *European Human Genetics Conference 2005.*

***"Molecular diagnosis of a 18q- fetus due to a der t(18;20)"***

Diego-Alvarez D, Rodriguez de Alba M, Sanchez-Rodriguez M, Cantalapiedra D, Ramos C, Lorda-Sanchez I. *5<sup>th</sup> European Cytogenetics Conference, 2005.*

***"MLPA as a screening of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages"***

Diego-Alvarez D, Rodriguez de Alba M, Ramos C, Trujillo-Tiebas MJ, Lopez-Martinez MA, Aneiros J, Ayuso C, Lorda-Sanchez I. *European Human Genetics Conference 2006.*

***"Parental origin in recurrent trisomic abortions"***

Lorda-Sanchez I, Diego-Alvarez D, Cardero-Merlo R, Maiques M, Diaz-Recasens J, Rodriguez de Alba M, Ramos C. *European Human Genetics Conference 2006.*

***"Use of the MLPA as a complementary technique for the assesment of a structural chromosomal mosaicism in prenatal diagnosis"***

Rodriguez de Alba M, Diego-Alvarez D, Plaza-Arranz J, Bustamante-Aragones A, Sanchez-Jimeno C, Infantes F, Ayuso C, Ramos C. *European Human Genetics Conference 2006.*

*"Estudio de anomalías cromosómicas en abortos espontáneos: de la citogenética clásica a la genética molecular"*

Diego-Alvarez D, Ramos C, Diaz-Recasens J, Cardero-Merlo R, Rodriguez de Alba M, Trujillo-Tiebas MJ, Gonzalez-Gonzalez C, Ayuso C, Lorda-Sanchez I. *XXIII Congreso Nacional de Genética Humana, 2006.*

*"Importancia del estudio cromosómico en restos abortivos"*

Cardero-Merlo R, Lopez-Martinez MA, Diego-Alvarez D, Lorda-Sanchez I, Rodriguez de Alba M, Vallespin E, Infantes F, Ramos C. *XIX Congreso Nacional de AETEL, 2006.*

*"New molecular cytogenetic techniques: implications for genetic counselling of infertile couples"*

Diego-Alvarez D, Rodriguez de Alba M, Trujillo-Tiebas MJ, Vallespin E, Bustamante-Aragones A, Ramos C, Ayuso C, Lorda-Sanchez C. *8<sup>th</sup> Course in Molecular Cytogenetics and DNA Microarrays, 2006.*

*"Rapid diagnosis of hydatidiform moles by QF-PCR"*

Diego-Alvarez D, Narvaiza RC, Avila-Fernandez A, Ramos C, Cardero-Merlo R, Trujillo-Tiebas MJ, Diaz-Recasens J, Aneiros J, Lorda-Sanchez I. *European Human Genetics Conference 2007.*

*"Chromosomal constitution assessment of spontaneous miscarriages: cytogenetic and molecular approach"*

Diego-Alvarez D, Ramos C, Rodriguez de Alba M, Trujillo-Tiebas MJ, Bustamante-Aragones A, Vallespin E, Cardero-Merlo R, Infantes F, Diaz-Recasens J, Lorda-Sanchez I. *6<sup>th</sup> European Cytogenetics Conference, 2007.*

*"Mosaicism and skewed inactivation of X-chromosome: its possible correlation to recurrent spontaneous abortions"*

Gutierrez-Serrano M, Diego-Alvarez D, Rodriguez de Alba M, Cardero-Merlo R, Infantes F, Ramos C, Plaza-Arranz J, Lorda-Sanchez I. *6<sup>th</sup> European Cytogenetics Conference, 2007.*

*"Nuevas técnicas moleculares en el estudio de anomalías cromosómicas en abortos espontáneos"*

Diego-Alvarez D, Bustamante-Aragones A, Cardero-Merlo R, Rodriguez de Alba M, Ramos C, Vallespin E, Infantes F, Ayuso C, Diaz-Recasens J, Lorda-Sanchez I. *XXIV Congreso Nacional de Genética Humana, 2007.*

# Diagnosis of common aneuploidies in spontaneous miscarriages

## by Quantitative Fluorescent - PCR with STR markers



D. Diego-Alvarez, I. Lorda-Sanchez, M.J. Trujillo-Tiebas, C. Gonzalez-Gonzalez, M. Garcia-Hoyos, V.M. Martinez-Gonzalez, F. Infantes, C. Ramos, C. Ayuso

Department of Genetics - Fundación Jiménez Díaz, Madrid (Spain)

Correspondence to Dan Diego Alvarez (ddiego@fjd.es)

### Introduction

More than 50% of spontaneous miscarriages carry chromosomal aberrations, being 96% of them numerical chromosome abnormalities. Conventional cytogenetic studies (karyotyping or FISH) of abortions encompass certain problems such as culture failure, infection or maternal contamination and need a moderate period of time in order to obtain results. For these reasons we have incorporated the QF-PCR technique to the study of spontaneous miscarriages since it has been described as a rapid, sensitive, accurate and reproducible diagnostic method.

QF-PCR is based on the assumption that within the exponential phase of PCR amplification the amount of specific DNA produced is proportional to the quantity of the initial target. By incorporating a fluorescent dye into the PCR products we are able to detect dosage ratios from the analysis of the fluorescent peak areas produced by a Genetic Analyzer.

That way, in normal heterozygotes the ratio of fluorescent activity for the two peaks should be close to 1:1 (disomic diallelic, figure 1A, a). Since STR (short tandem repeats) markers are highly polymorphic, few normal subjects should be homozygotes that show one peak of activity (disomic monoallelic, figure 1B, b). Besides, in a trisomic patient the three doses of an STR marker can be detected either as three peaks of fluorescent activity with a ratio 1:1:1 (trisomic triallelic, figure 1B, c) or as a pattern of

Multiple peaks with a dosage close to 2:1 (trisomic diallelic, figure 1A, d).

165 miscarriage samples have been studied so far. These samples were provided by the obstetrical service of FJD and some private clinics. DNA from abortions was extracted from both frozen and formaline fixed tissues or cellular cultures. Whenever possible, parental DNA was obtained from peripheral blood samples. The extraction was done following standardized or commercial protocols.

A rapid screening of sex and numerical anomalies for chromosomes 21, 18, 13, X and Y was carried out in our clinical abortions. Two multiplex PCRs (PCR-A and PCR-B) were performed with the amelogenin (AMXY) primers and the STR markers shown in table I. Positive cases for some of these numerical anomalies were validated employing at least two more markers of the same chromosome. Cases in which we did not detect numerical anomalies for these chromosomes were screened with another set of chromosome markers for chromosomes 15, 16 and 22 (table II). Fluorescence-labelled PCR products were electrophoresed in the ABI

Genetic Analyzer and analysed with the GeneMapper software package (Applied Biosystems).

Those cases in which a cytogenetic result was obtained were used as controls to confirm our results (figure 2), finding no discrepancies in 98.2 % of them. Discrepancies could be due to either mishandling of samples or to the incorrect collection of them (this will be determined by processing parental DNA).

Some of the cases in which cytogenetic diagnosis failed (25 %) were diagnosed of having different numerical chromosome anomalies by QF-PCR, as shown in table III.

In those cases in which we were able to obtain parental DNA, both fetal origin of the sample and the origin of the extra chromosomal material could be determined by comparing amplification patterns of STR markers of the parents (figure 1). It also allowed to discard maternal origin or contamination of samples, as explained on figure 3.

The clinical diagnosis of a hydatidiform mole was confirmed (figure 4).

Table III: Number of numerical chromosome anomalies diagnosed by QF-PCR in 42 spontaneous miscarriages in which karyotyping failed.

Numerical chromosome anomaly	Number of cases
Trisomy 13	7
Trisomy 15	1
Trisomy 18	2
Trisomy 21	2
Trisomy 22	2
Monosomy X	2
Triploidy	4
Total of cases diagnosed:	20 (48%)

Table I: Fluorescence-labelled STRs and primers\* used in QF-PCR for sexing and screening of numerical chromosome anomalies in spontaneous miscarriage DNA samples for chromosomes 13, 18, 21, X and Y.

Marker	Chromosome location	Heterozygosity	Nucleotide repeat
PCR-A			
AMXY	Xp 22.1-22.3 / Yp 11.2	—	—
D13S631	13q 31-32	0.94	Tetra
D18S355	18q 12.2-12.3	0.92	Tetra
D21S1414	21q 11.2	0.88	Tetra
PCR-B			
X22	Xq 28 / Yqter	0.87	Penta
XHPRT	Xq 26.1	0.85	Tetra
D13S634	13q 14.3-22	0.81	Tetra
D18S386	18q 22.1-22.2	0.88	Tetra
D21S1411	21pter-qter	0.93	Tetra

Table II: Fluorescence-labelled STRs\* employed in QF-PCR for detection of numerical chromosome anomalies for chromosomes 15, 16 and 22.

Marker	Chromosome location	Heterozygosity	Nucleotide repeat
D15S113	15q 11-13	0.73	Di
D15S123	15 pter-qter	0.80	Di
D15S131	15 q22-qter	0.83	Di
D16S539	16q 23.1	not described	Tetra
D16S3022	16 pter-qter	0.78	Di
D16S420	16q 12.3	0.82	Di
D22S264	22q 11.2	0.80	Di
D22S427	22 pter-qter	0.63	Di

\*Primer sequences and other information is available in the Genome Database ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

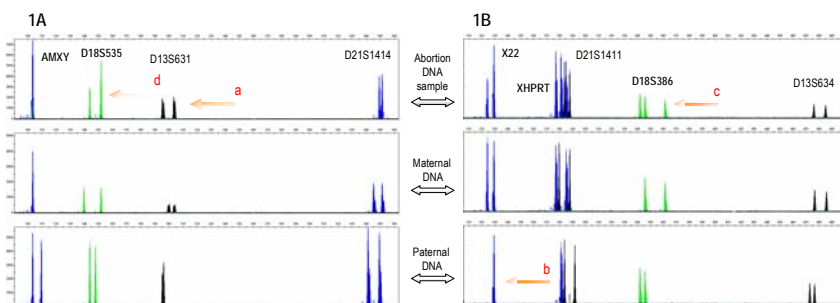


Figure 1: Detection of paternal origin of trisomies in a double trisomy miscarriage (48, XXX + 18) by QF-PCR.

Electropherograms: abortion and parental DNAs amplified with fluorescence-labelled primers and different STR markers.

Amplification of the amelogenin marker (AMXY) in miscarriage and maternal samples result in a peak corresponding to the X chromosome; another peak for the same marker in paternal sample corresponds to the Y chromosome.

X-trisomy is evidenced by trisomic diallelic pattern for X22 and trisomic triallelic pattern for XHPRT. Trisomy 18 is confirmed by trisomic diallelic pattern for D18S535 and trisomic triallelic pattern for D18S386.

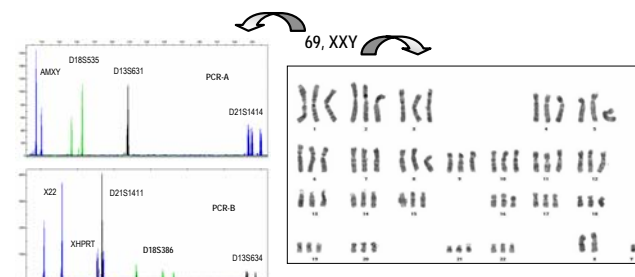


Figure 2: Confirmation of QF-PCR diagnosis of triploidy with GTG-banded karyotype.

The karyotype shows a 69, XXY abortion; electropherogram shows two sets of PCR markers amplified by QF-PCR.

AMXY products reveal the presence of Y chromosome; XHPRT confirms the presence of two X chromosomes. Patterns of amplification: trisomic monoallelic (D13S631 and D21S1411), trisomic diallelic 2:1 (D18S535, AMXY and X22) and trisomic triallelic 1:1:1 (D21S1414, D18S386 and D13S634).

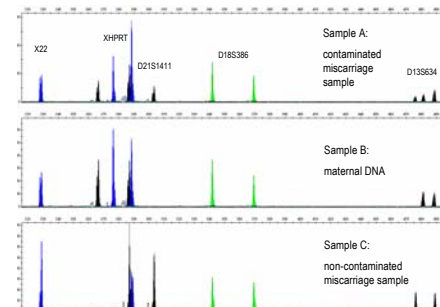


Figure 3: Evidence of maternal DNA contamination of an abortion DNA sample

Samples A and C: DNA obtained from different tissue collection after curettage of a spontaneous abortion (6 weeks gestation); sample B: maternal DNA (blood).

Sample A: Amplification pattern for informative STRs (D13S634 and D21S1411) shows four doses. By comparing maternal pattern to miscarriage ones we can conclude that sample A was contaminated with maternal blood or tissue before DNA extraction.

### Conclusions

Based on our experience, QF-PCR can be considered as a complementary and reliable tool to cytogenetic studies of spontaneous miscarriages due to:

- It provides results in cases in which cytogenetic diagnosis fails.
- Despite the deterioration of the sample, the percentage of success using QF-PCR is higher than karyotyping.
- It is a rapid technique as it takes around 48 hours from the reception of the sample to the time a diagnosis is established.
- It allows the determination of the fetal origin of the sample and discarding maternal contamination by comparing the fetal DNA to the parental DNA using the same markers.
- It is a relatively low cost technique.

### Acknowledgements

Everyone at the Department of Genetics of FJD for its supporting. Dan Diego Alvarez is sponsored by Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz. This research was supported by a grant from F.I.S. (02/0068).

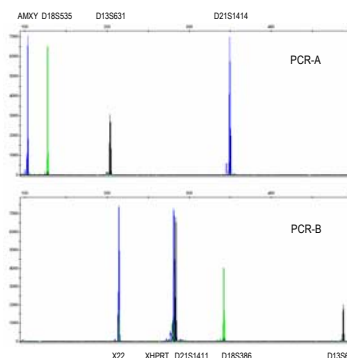


Figure 4: Confirmation of the clinical diagnosis of a hydatidiform mole using STR markers by QF-PCR

It has been described that complete moles lack a fetus and are always diploid and androgenetic in origin, having two sets of paternal chromosomes. They are most often XX and homozygous, the most likely origin being by duplication of a haploid sperm. That is consistent with our results, in which we have detected the X chromosome amelogenin product and a homozygous pattern of amplification for each STR marker employed.

Work in progress consists in confirming paternal origin of mole by comparing paternal DNA using the same markers.

# DOUBLE TRISOMY IN SPONTANEOUS ABORTIONS



I Lorda-Sanchez, D. Diego-Alvarez, J. Diaz-Recasens, M. Rodríguez de Alba, MJ Trujillo-Tiebas, C. García-Arevalo, R. Cardero, C. Ramos

Servicio de Genética y Servicio de Ginecología, Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

## INTRODUCTION

### SPONTANEOUS ABORTIONS

- More than 60% of the spontaneous abortions (SAs) in the first trimester have an abnormal karyotype.

- The most common abnormality observed is trisomy.

### DOUBLE TRISOMY

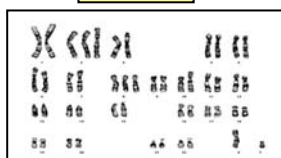
- Double trisomies are extremely rare in liveborns, and always implicate a sex chromosome. Their frequency among karyotyped SAs varies in the literature from 0.21 to 2.8%.

## CASES

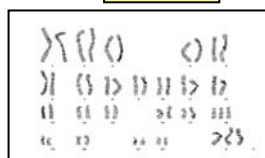
We have found 6 cases of double trisomy among 358 SAs karyotyped in our laboratory (1.7 %).

CASE	Gestation age (wks)	Maternal age	Paternal age	Gestations Grávida/Para/Abortions	Karyotype
1	10	45	36	G6/P2/A4	48,XX,+9,+21
2	7	37	39	G4/P2/A2	48,XX,+15,+22
3	8	40	49	G4/P2/A2	48,XX,+8,+21
4	9	36	35	G3/P2/A1	48,XY,+2,+8
5	11	40	42	G3/P1/A2	48,XX,+20,+22
6	13	37	43	G3/P1/A2	48,XXX,+18
Mean	9.6	39.2	40.6		

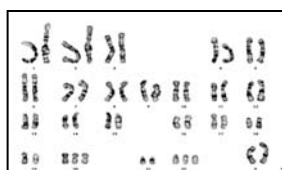
48,XY,+2,+8



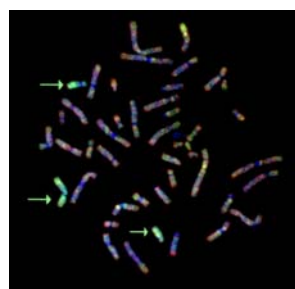
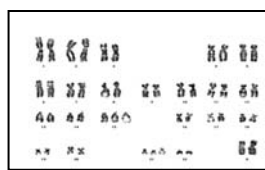
48,XXX,+18



48,XX,+20,+22



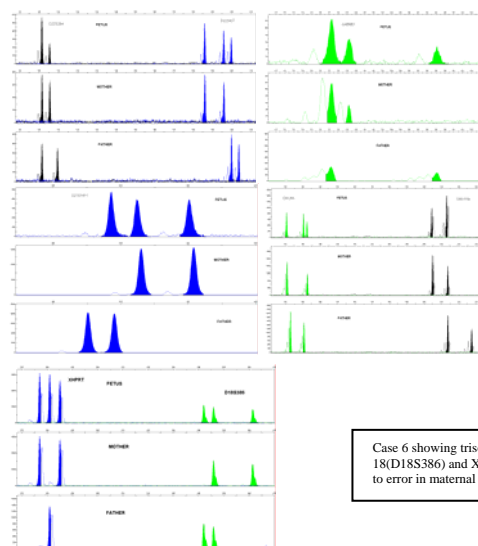
48,XY,+15,+21



CGH of case 6: Arrows show chromosomes X and 18 painted in green

## ORIGIN OF TRISOMIES

In cases 2, 3 and 6, we determined the origin of the trisomies by comparing the inheritance of microsatellite markers. The results were consistent with a maternal origin due to a meiosis-I error of both extra-chromosomes in the three cases.



Case 2 showing trisomies 15 (GBRA) and 22 (D22S264 and D22S427) due to error in maternal meiosis I

Case 3 showing trisomies 8 (DS8265;D8S1759) and 21 (D21S1411) due to error in maternal

Case 6 showing trisomies 18 (D18S386) and X (XHPTR) due to error in maternal meiosis I

## DISCUSSION

- **CHROMOSOMES-** Acrocentric chromosomes were the most frequently implicated (5/12), as described in literature, but other aneuploidies frequently reported, like chr-16, are absent in our cases (Reddy,1997).
- **GESTATIONAL AGE-** The low gestational age (mean 9.6 weeks) observed is in accordance to the previously described. The highest gestational age corresponds to the case in which a sex chromosome was implicated. These double trisomies have been observed in liveborns (Li et al, 2004).
- **PARENTAL AGE-** There is an **increased maternal** (mean 39.2 years) and **paternal** (mean 40.6 years) **age** in these cases.
- **ORIGIN-** The results were consistent with a **maternal origin** due to a meiosis-I error of both extra-chromosomes. This contrasts with the previously described origin of a double trisomy in SAs (Robinson et al,2001), which was a consequence of both a maternal and paternal meiotic error. However it concurs with the idea that double trisomy, like single trisomy, is predominantly a result of meiotic errors related to increased maternal age.
- **RISK-** Since the majority of the double trisomies were observed within couples with recurrent SAs, a **higher risk for aneuploidy** within this population can not be excluded.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a grant from F.I.S (02/0068) and INERGEN (FISC03/05) Dan Diego Alvarez is sponsored by Fundación Conchita Rabago de FJD

### REFERENCE

Reddy (1997) Hum Genet 101:339-345  
Robinson et al(2001) Am J Hum Genet 69: 1245-1254  
Li et al, (2004) Am J Med Genet 124A:96-98



# Molecular study of miscarriages with unbalanced reciprocal translocations



D. Diego-Alvarez<sup>1</sup>, A. Bustamante-Aragón<sup>1</sup>, M. Rodríguez de Alba<sup>1</sup>, R. Cardero<sup>1</sup>, C. Ayuso<sup>1</sup>, J. Díaz Recaséns<sup>2</sup>, C. Ramos<sup>1</sup>, I. Lorda-Sánchez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics; <sup>2</sup>Obstetrical and Gynecological Service; Fundación Jiménez Díaz - Madrid (Spain)

Correspondence to Dan Diego-Alvarez (ddiego@fjd.es)

## Introduction:

- Spontaneous abortions (SAs) occur in  $\approx 10\text{--}15\%$  of clinically recognised pregnancies.
- Chromosomal anomalies account for at least 50% of first trimester SAs.
- Balanced translocation carriers have an increased risk of having abnormal embryos.
- Conventional karyotyping of abortions presents a high rate of failure caused by the macerated status of tissue or selective growth of maternal cells in culture.
- Molecular studies of DNA such as QF-PCR and CGH can provide a useful tool to diagnose numerical chromosome anomalies in those cases in which karyotyping fails.
- Molecular results can also be obtained faster than cytogenetic ones.

## Reported Cases:

- We present the molecular approach of a first trimester spontaneous miscarriage and a voluntary termination of pregnancy (TOP) derived from couples in which one partner carried a balanced reciprocal translocation:

### Case one:

Spontaneous miscarriage of 9<sup>+</sup>6 weeks of gestation.

Paternal karyotype: 46, XY,t(2;17)(q32.1; q24.3)

### Case two:

TOP at 16<sup>+</sup>3 weeks of gestation; ultrasonographic findings compatible with trisomic phenotype in the fetus.

Maternal karyotype: 46, XX,t(1;13)(q31.2; q32)

## Material and Methods:

- Cells were cultured in both cases in order to obtain fetal karyotype.
- DNA was isolated from fetal tissue remains after surgical evacuation (case 1) and from amniotic fluid sample (case 2).
- QF-PCR with STR markers specific for chromosomes 2, 17 (case one) and 1, 13 (case two) was performed in order to determine numerical anomalies and to establish the quadrivalent pattern of segregation (figure 1).
- CGH was also carried out in case one.

## Results:

### Case one:

- STR analysis by QF-PCR revealed a complete trisomy 2 due to a 3:1 segregation (figure 2).
- Culture failed and no cytogenetic result could be obtained.
- QF-PCR results were confirmed by CGH.

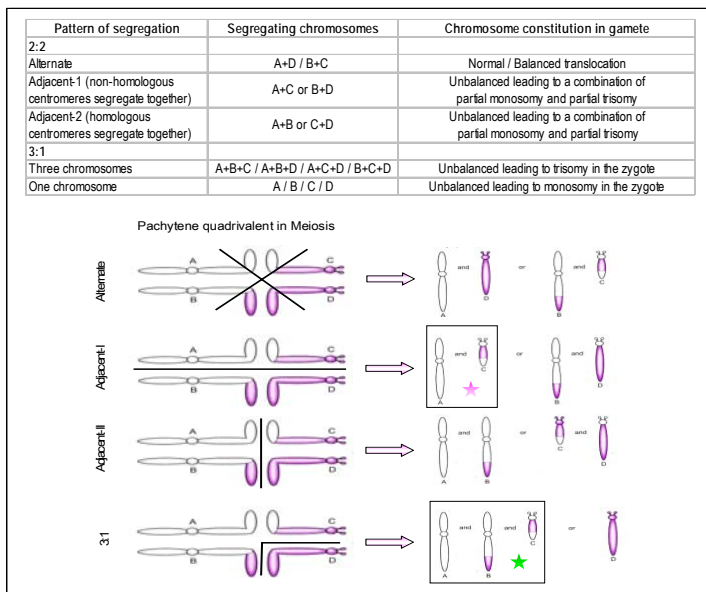


Figure 1: Segregation patterns of a reciprocal translocation

### Case two:

- STR analysis showed partial monosomy 13q32 > qter and partial trisomy 1q31.2 > qter in the fetus caused by an adjacent-I segregation (figure 3).
- Cytogenetic results confirmed the QF-PCR ones two weeks later.

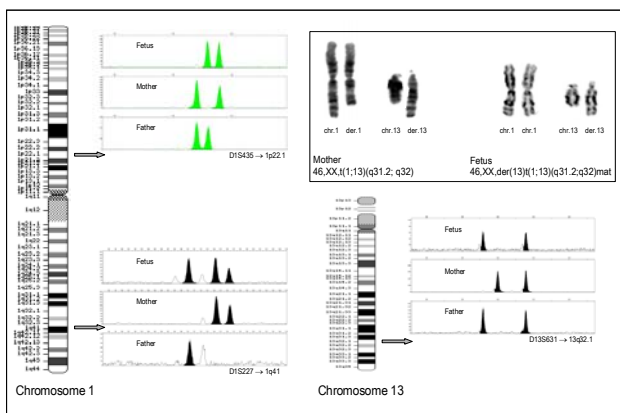


Figure 3: The amplification pattern for the analysed STR markers agrees with the suspicion of an adjacent-I segregation, as confirmed later by karyotype analysis.

## References:

- Diego-Alvarez *et al.* (2005) "Application of quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages".
- Lorda-Sanchez *et al.* "Trisomy 2 due to a 3:1 segregation in an abortion studied by QF-PCR and CGH" (Submitted).

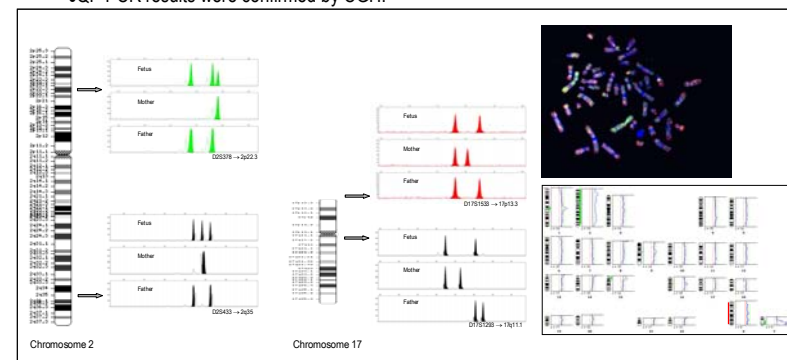


Figure 2: Trisomic pattern of amplification for STR markers located in both arms of chromosome 2 in addition to CGH profile, that shows gain (in green) of the whole chromosome 2, and the disomic pattern for chromosome 17, suggest that quadrivalent pattern of segregation was 3:1.

## Discussion:

- A molecular result could be established in both cases with QF-PCR, while in the first case the culture failed.
- Molecular studies require less time (from 24 to 72 hours) than karyotyping (two or three weeks).
- Previous knowledge of a parental translocation can help this sort of studies by focusing mostly in the chromosomes involved.

## Conclusions:

- Molecular studies are faster than karyotyping and are also more reliable for determining which are the derivative chromosomes in the embryo when a balanced translocation is previously known in the parents.
- We propose QF-PCR in addition to CGH as an efficient diagnostic method to improve our knowledge of unbalanced offspring in balanced translocation carriers.

## Acknowledgements:

We thank Diego Cantalapiedra for the English language assistance and everyone at the Hospital that makes these studies possible. Dan Diego Alvarez is sponsored by "Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz". This research was supported by a grant from F.I.S. (02/0068).



# Heterozygosity of eight STR markers studied by QF-PCR in Spanish population

A. Bustamante-Aragones, M. Lazaro, M. Garcia-Hoyos, D. Diego Alvarez, R. Cardero, M. Trujillo, C. Ayuso, C. Ramos.



Fundacion Jimenez Diaz, Madrid, Spain

Correspondence to: abustamante@fjd.es



## Introduction:

QF-PCR is a recent method for rapid detection of chromosome dosage based on the analysis of highly polymorphic STR markers. Optimal markers must have a large number of alleles with a low frequency to give enough information to discriminate the presence of aneuploidies. The application of this technique in the prenatal diagnosis field had permitted the diagnosis of the most common aneuploidies in less than 24 hours, reducing maternal anxiety. However it is important to assess the heterozygosity of these markers for a reliable diagnosis.

This study started as we set up the QF-PCR technique applied to prenatal diagnosis in our laboratory. We considered important to know if the presence of a certain percentage of pregnant women from other different races would alter the heterozygosity of the STRs previously described.

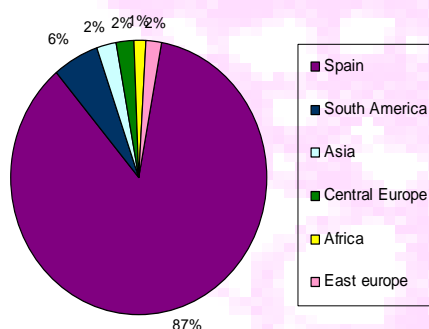


Fig.1 Distribution of the pregnant population according to the different races.

## Samples and Methods:

We have analyzed DNA from a total of 283 samples randomly selected including blood and amniotic fluid samples using eight markers for chromosomes 13, 18, 21 X and Y. Each sample was analyzed by two multiplex PCR assay: PCR-A (D18S535, D13S631, D21S1414) and PCR-B (X22, XHPRT, D21S1411, D18S386, D13S634) (Fig.2, Fig.3). In cases which both markers for the same chromosome were homozygote (non informative) it was used another markers for that chromosome.

Samples were amplified by QF-PCR and analyzed by GeneMapper software in an ABIPrism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Informativeness of a marker can be quantitatively measured by a statistic called the polymorphism information content (PIC). The PIC value of a marker is defined as the expected fraction of informative offspring. A PIC value greater than 0.7 is considered to be highly informative. To know how polymorphic each marker, PIC (Polymorphism Information Content) was calculated by the formula:

$$PIC = 1 - \sum P_i^2 - \sum P_i^2 P_j^2 \quad i=1, j=i+1$$

The data obtained are compared with two series previously reported (See table).

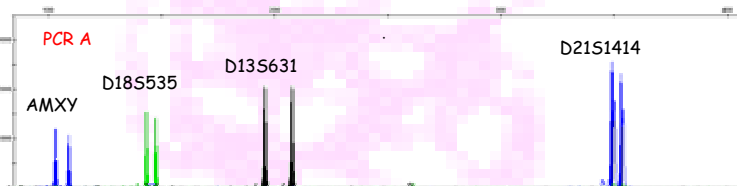


Fig. 2 Markers analyzed in PCR-A assay

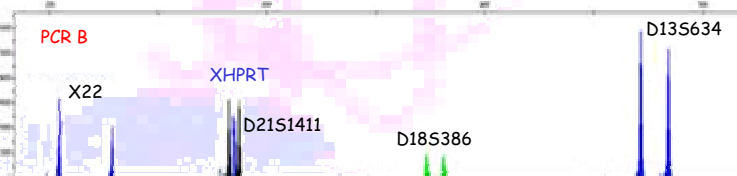


Fig. 3 Markers analyzed in PCR-B assay

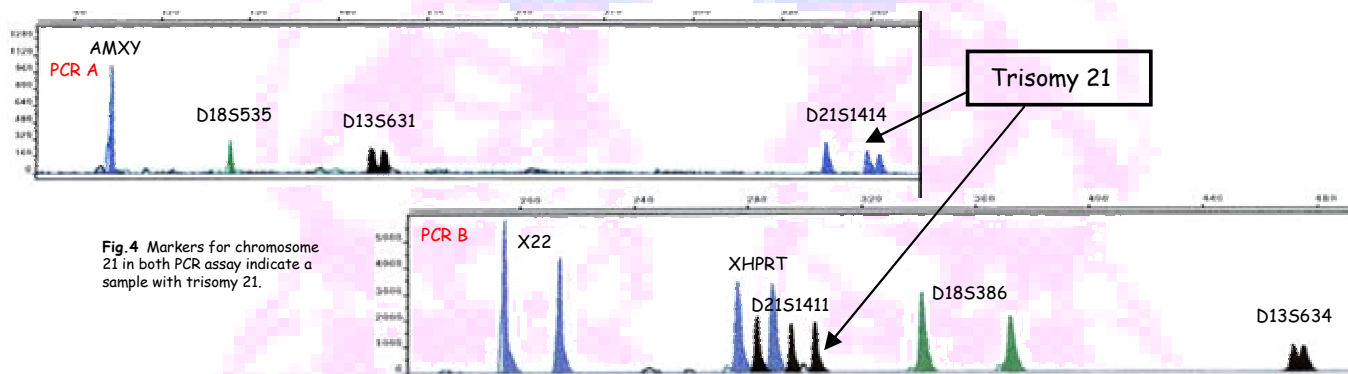


Fig. 4 Markers for chromosome 21 in both PCR assay indicate a sample with trisomy 21.

Marker	Chromosome location	Number of Homozygotes	Allele Range	Number of Alleles	PIC	Heterozygosity by Adinolfi, Pertl & Sherlock (1997)	Heterozygosity in spanish population (2001)
D13S631	13q32.2	53/261	188-212	7	0.76	0.94	0.76
D13S634	13q14.13	46/224	462-496	9	0.80	0.81	0.87
D18S535	18q12.3	73/283	127-151	8	0.75	0.92	0.79
D18S386	18q22.1-22.2	17/221	318-402	21	0.91	-----	0.95
D21S1414	21q21.1	62/267	326-366	11	0.80	0.88	0.80
D21S1411	21q22.3	35/261	267-315	13	0.88	0.93	0.90
X22	Xq28/Yqter	28/238	196-244	14	0.80	-----	0.85
XHPRT	Xq26.1	25/265	273-297	8	0.70	0.73	0.76

## Results:

Despite the percentage (13%) of women from other races in our pregnant population, the markers used for the QF-PCR are informative enough for these studies since the PIC is higher than 0.7.

However we found significant differences between our data and those firstly reported by others studies (Adinolfi et al, 1997) (marked in ●). These differences are strongly significant (95% Confidence Interval) for D13S631, D18S535 (see table).

Nevertheless our data are similar to those obtained in another study in the Spanish population.

## Comments:

The eight markers analyzed in this study are informative enough, for our pregnant population, in order to discard possible aneuploidies. XHPRT is the marker with the lowest PIC, its value is in the limit, so maybe this STR should be changed by another one for X chromosome.

## Conclusions:

- Information about the heterozygosity in other populations should be studied in order to know about the informativeness of the markers.
- Since  $PIC > 0.7$ , these markers are informative enough in our population for the aneuploidy study using QF-PCR.
- Additional markers are sometimes needed so this study should be also performed with them.
- The pregnant population from other races in our country is increasing so we consider that this data should be periodically reviewed.

## Bibliography:

- Cirigliano V, Ejarque M, Canadas MP, Lloveras E, Plaja A, Perez MM, Fuster C, Egozcue J. Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies. Mol Hum Reprod. 2001 Oct;7(10):1001-6
- Adinolfi M, Pertl B, Sherlock J. Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction Prenat Diagn. 1997 Dec;17(13):1299-311

## Acknowledgements:

Ana Bustamante is supported by "Fundacion Conchita Rabago de Jimenez Diaz" The Ministry of Health supports this project

# Molecular diagnosis of a 18q- fetus due to a der t(18;20)\*



Diego-Alvarez, D.<sup>1</sup>, Rodríguez de Alba, M.<sup>1</sup>, Sánchez-Rodríguez, M.<sup>2</sup>, Cantalapiedra, D.<sup>1</sup>, Ramos-Corales, C.<sup>1</sup>, Lorda-Sánchez, I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genetics Service; <sup>2</sup>Anatopathologic Service; Fundación Jiménez Díaz - Madrid (Spain)

Correspondence to Dan Diego-Alvarez (ddiego@fjd.es)



5th European Cytogenetics Conference  
50 years of human cytogenetics  
June 4-7, 2005 - Madrid, Spain

## Introduction:

Reciprocal translocations occur in approximately 1 in every 500 live births. Balanced carriers are phenotypically normal, but have an increased risk of infertility, chromosomally unbalanced offspring and recurrent miscarriages. Carriers are not usually diagnosed until these situations take place.

Karyotyping of miscarriages is highly recommended even in the case of the first spontaneous abortion. Conventional cytogenetic studies encompass certain problems such as culture failure, infection of the sample or maternal contamination, and need a moderate period of time in order to obtain results. Molecular cytogenetic techniques such as QF-PCR<sup>1</sup>, CGH and MLPA provide a reliable tool for studying numerical chromosome anomalies in the fetus. Moreover, focused analysis of DNA STR markers by QF-PCR can provide information about the mode of ascertainment of the quadrivalent segregation of meiotic chromosomes in the products of conception of balanced reciprocal translocation carriers<sup>2</sup>.

## Case report:

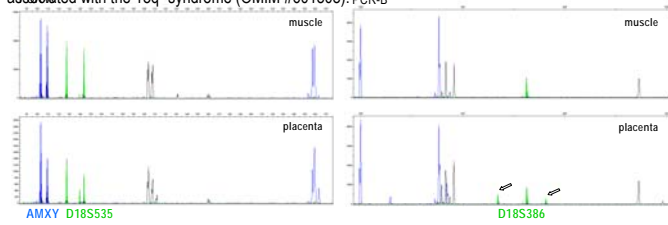
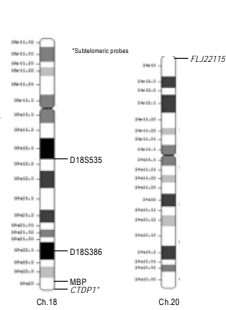
We report the molecular study of a 21 week gestation miscarriage. It was the second clinically recognized pregnancy of a 32-year-old woman. The first one ended in spontaneous abortion at 10 weeks of gestation. Sonographic examination of the second pregnancy revealed hydrocephaly with enlarged lateral ventricles at the 20<sup>th</sup> week of gestation. The pregnancy was interrupted and the fetus was remitted for genetic and anatomopathologic studies.

## Study approach:

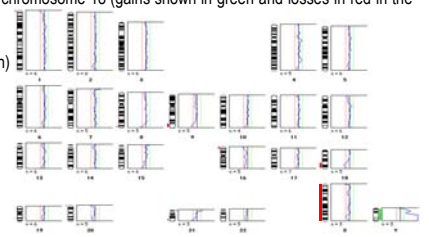
Muscle tissue of the fetus was cultured in order to obtain fibroblasts to perform cytogenetic studies by conventional protocols. DNA was extracted from both muscle and placental tissue separately in order to perform molecular studies.

Multiplex QF-PCR assays with STR markers specific for chromosomes 13, 18, 21, X and Y were performed in both DNA samples (muscle and "placenta"). Fluorescence-labelled PCR products were electrophoresed in an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

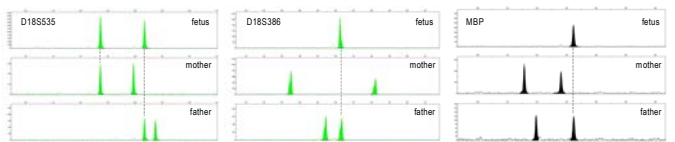
Amplification pattern of amelogenin (AMXY) revealed the presence of the X and Y chromosomes in the muscle DNA sample. Amplification pattern of "placental DNA" revealed the presence of maternal DNA contamination in that sample (placental tissue usually carries maternal blood clots), shown as a minor extra allele for some markers. By analysing the D18S386 marker, we noticed that the fetus (muscle DNA sample) lacked both of the maternal alleles present in the contaminated DNA sample (see arrows in the figure). For the D18S535 marker, the fetus had the normal disomic contribution of one allele inherited from each parent. Since D18S386 is located within the 18q22.1 region of the chromosome, we suspected a 18qter deletion, associated with the 18q- syndrome (OMIM #601808). PCR-B



Conventional CGH was then performed. Results, obtained 72 h later, agreed with a terminal deletion of chromosome 18 (gains shown in green and losses in red in the CGH profile), that could be inherited (due to translocation) or *de novo*.

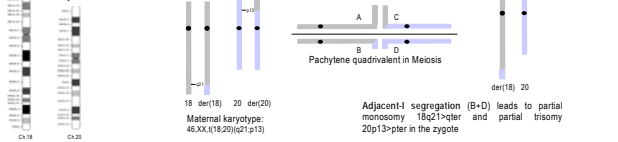


Parents were then called in for blood extraction, in order to perform karyotypes and DNA studies. QF-PCR analysis comparing parental STR markers to the abortion ones confirmed the deletion of the distal long arm of chromosome 18 of maternal origin in the fetus, as no maternal allele in this region was present in the fetus.



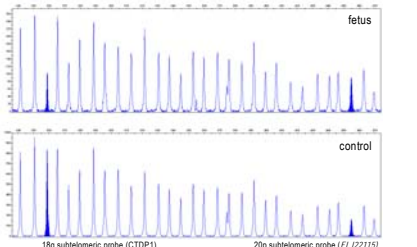
Chromosomal constitution in the gamete ascertained from a reciprocal translocation depends on the segregation pattern of chromosomes during meiosis. A quadrivalent structure is formed to ensure the correct pairing of the homologous regions of the chromosomes. While the 3:1 segregation leads to complete trisomy and the alternate segregation produces balanced embryos, what leads to partial monosomy (and partial trisomy) in the zygote is the adjacent segregation.

In our case, the one that would lead to partial monosomy 18qter is the adjacent-I segregation (*however, an alternate segregation after a cross-over event within the interstitial segment could not be distinguished from an adjacent-I*).



Since analysis with the conventional CGH technique is not recommended for the study of centromeric and subtelomeric regions due to the presence of repetitive sequences that are common among the different chromosomes, we could not detect the partial trisomy 20p13>pter in the fetus.

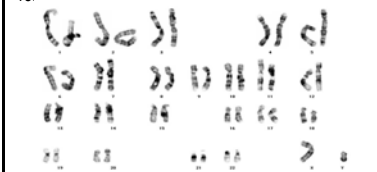
The use of MLPA with subtelomeric probes finally revealed the partial trisomy 20p13>pter in the abortion (showed as a peak area ratio of 1.5 relative to the 1.0 of the control) and the partial monosomy 18q21>qter (0.5 vs. 1.0 in the control).



Maternal karyotype showed an apparently balanced 46,XX,t(18;20)(q21;q13). Paternal karyotype was 46,XY.



The karyotype of the abortion was obtained two weeks later, showing concordance with molecular results: 46,XY,der(18)t(18;20)(q21;q13)mat



## Conclusions:

We propose the use of molecular cytogenetic techniques as an efficient and rapid diagnostic method to improve our knowledge of unbalanced offspring in balanced translocation carriers. Knowing the exact cause of miscarriages also helps to rapidly reduce maternal anxiety and self-blame feeling, and leads to an appropriate genetic counselling offered to couples in further pregnancies.

Acknowledgements: Everyone at the Genetic Service of FJD for its helping and supporting, specially to Rocío Cardero. Dan Diego Alvarez is sponsored by "Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz". This research was supported by a grant from F.I.S. (02/0068).

References:  
1-Diego-Alvarez et al. (2005) Application of quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages. Human Reproduction.  
2-Lorda-Sanchez et al. (2005) Trisomy 2 due to a 3:1 segregation in an abortion studied by QF-PCR and CGH. Prenatal Diagnosis (in press).

\*Title might be changed as further researches have been performed in this abortion after abstract submission was done.



# MLPA as a screening of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages



Diego-Alvarez D<sup>1</sup>, Rodríguez de Alba M<sup>1</sup>, Ramos C<sup>1</sup>, Trujillo-Tiebas MJ<sup>1</sup>, Lopez-Martínez M<sup>1</sup>, Aneiros J<sup>2</sup>, Ayuso C<sup>1</sup>, Lorda-Sánchez I<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genetics Service; <sup>2</sup>Anatomopathologic Service; Fundación Jiménez Díaz - Madrid (Spain)

Correspondence to Dan Diego-Alvarez (ddiego@fjd.es)



## INTRODUCTION

Embryo loss represents around 15% of clinically recognized pregnancies (Miller *et al.*, 1980). Among presumptive causes of pregnancy loss, chromosomal anomalies account for more than 50% of first trimester spontaneous abortions (SAs) (Hassold *et al.*, 1980).

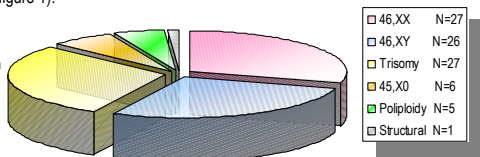
Identification of the cause of fetal loss significantly reduces long-term psychological distress and self-blame feelings in women with a miscarriage (Nikčević *et al.*, 1999) and enables offering an improved genetic counselling to these couples in the following pregnancies.

Routine cytogenetic study of miscarriages entail high rates of culture failure or misdiagnosis due to maternal cell contamination. Moreover, some authors support the hypothesis that cell culture may yield normal karyotypes or selected abnormal ones that allow *in vitro* cell proliferation, suggesting that rates of abnormalities uncommonly seen by conventional cytogenetics may be more frequent than the reported ones (Benkhalifa *et al.*, 2005).

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) technique (Schouten *et al.*, 2002) permits the relative quantification of up to 48 different DNA sequences in a simple and unique assay, enabling the detection of deletions, duplications, or whole chromosome aneuploidies. SALSA P036B and P070 MLPA probe-mixes (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) contain different specific probes for subtelomeric regions of every chromosome (for acrocentric chromosomes, probe recognition sequences are within one of the first genes closest to the centromere) as well as two probes for non-telomeric Y chromosome specific sequences (detected gene and chromosomal location of probes are available in <http://www.mrc-holland.com>, see table).

The aim of the present study is to establish the feasibility of MLPA using subtelomeric probe mixes as a first approach to detect aneuploidies and unbalanced terminal chromosomal rearrangements of every chromosome in a single assay in spontaneous miscarriage samples. For this purpose, 92 karyotyped miscarriages serving as controls have been employed (figure 1).

Figure 1: chromosomal constitution of the 92 karyotyped spontaneous miscarriages included in the present study.



## RESULTS

Among normal male and female miscarriages, probe deletions and duplications were found:

ab-1 → XYq del of SYBL1 probes (P036B and P070)

ab-10 → 15p dup of CYFIP1 probe (P036B)

ab-21 → 16p dup of POLR3K (P036B) and DEC2 (P070) probes

ab-60 → 9q del of MRPL41 probe (P036B)

All of the trisomies of karyotyped miscarriages [+5(1), +7(2), +10(3), +13(3), +15(1), +16(5), +18(3), +20(1), +21(4), +22(1) +15+22(1), +8+21(1) and +18+22(1)] appeared as duplication of both probes for each probe-mix, but:

ab-48 (tris 13) → PSCP1 probe (P036B) did not appear duplicated

ab-175 (tris 20) → 16p dup of DEC2 probe (P070)

45,X0 miscarriages showed del of XY probes, but:

ab-167 → showed also 1p dup for TNFRSF18 probe (P070)

ab-179 → did not show del of XYp (P036b and P070) probes

Normal values for all probes were obtained in polyploid miscarriages

ab-69 carried an unbalanced translocation [46,XY,der(18)t(18;20)(q21;p13)mat] showed as dup of 20p probes (partial trisomy) and del of 18q probes (partial monosomy) (see figure 2)

## DISCUSSION

Complete aneuploidies could be detected by MLPA as duplication or deletion of both subtelomeric probes for each probe-mix (except for case ab-48, which would represent a false negative result).

Some polymorphisms in copy number that appear in the present study are quoted in MRC-Holland page, i.e.:

CYFIP1 (15p P036B) probe which appears duplicated in ab-10 is deleted in some Prader-Willy / Angelman syndrome patients, but it is also supposed to be polymorphic in copy number in some healthy individuals.

P036B and P070 probes for 1p have been found to be duplicated in a normal individual, suggesting that it might be a polymorphism.

P036B probe for 9q is known to give variable results between two laboratories.

Moreover, some other polymorphisms may arise as more normal individuals are studied.

Normal karyotypes could hide cryptic deletions or duplications incompatible with life not detected by conventional cytogenetic techniques. Nevertheless, as punctual deletions and duplications found in our samples could not have been confirmed yet, polymorphisms of those genes can not be discarded.

As expected, polyploidy could not ever be detected by this technique. As frequency of polyploidy represents ~16% of chromosomal anomalies among first trimester SAs, this would limit diagnosis in a high percentage of pregnancy losses.

Unbalanced chromosomal rearrangements ascertained from a reciprocal translocation could be detected.

## MATERIAL AND METHODS

Miscarriage samples consisted on chorionic villi, embryo or placental tissue obtained after delivery or surgical evacuation between the 5<sup>th</sup> and 39<sup>th</sup> week of gestation.

After dissection of 100-150 mg of tissue and chemical digestion with proteinase K at 56°C during 48-72 h, DNA was isolated with the Tissue Kit reagents and the BioRobot EZ1 (QIAGEN) following supplied protocols.

MLPA technique is based on the amplification of specific probes previously hybridised onto target DNA sequences. It permits the relative quantification of up to 48 different DNA sequences in a single reaction requiring only 20 ng of DNA. Each probe consists of two oligonucleotides that hybridise to adjacent sites of the target sequence in the DNA. Once hybridised probe oligonucleotides are ligated, amplification by PCR with a unique primer pair (all ligated probes contain identical end sequences) is performed. Each probe gives rise to an amplification product of unique size between 130 and 480 bp (length differences between the amplification products of two probes is 6-8 bp) (figure 2). As the amount of specific probes that are amplified depends on the quantity of target sequences present in the DNA, it allows the relative quantification of such sequences, enabling the detection of copy number changes such as deletions or duplications.

MLPA reactions were performed as recommended by the manufacturer's protocol with minor modifications.

Data analysis: Although it can be relatively easy to detect deletions or duplications of targeted regions by analysing electropherograms (as a decrease or increase of the probe's peak pattern) if few samples are simultaneously shown, data should be normalized before finalizing conclusions. The peak areas obtained from the amplification products were exported to a Microsoft Excel spreadsheet. Data normalization was achieved by dividing each probe's signal strength by the average signal strength of each and the four closest probes and then, by dividing this normalized data by the average peak pattern of at least four normalized control samples included in the same experiment. Results should only be compared within the same experiment.

Probe recognition sequence deletion or duplication will be apparent by a 35-50% variation of the relative peak area of the amplification product of that probe. Aneuploidy may be suspected if probes for both arms of a chromosome appear duplicated (trisomy) or deleted (monosomy). In addition, an unbalanced product from an adjacent segregation in meiosis ascertained from a reciprocal translocation in gametocytes will lead to a combination of partial monosomy and partial trisomy of the chromosomes involved in the rearrangement.

When not concordant results between the two probe mixes were obtained, the assay was repeated. When possible, conventional CGH, FISH and/or microsatellite analysis by QF-PCR were performed in order to validate MLPA results.

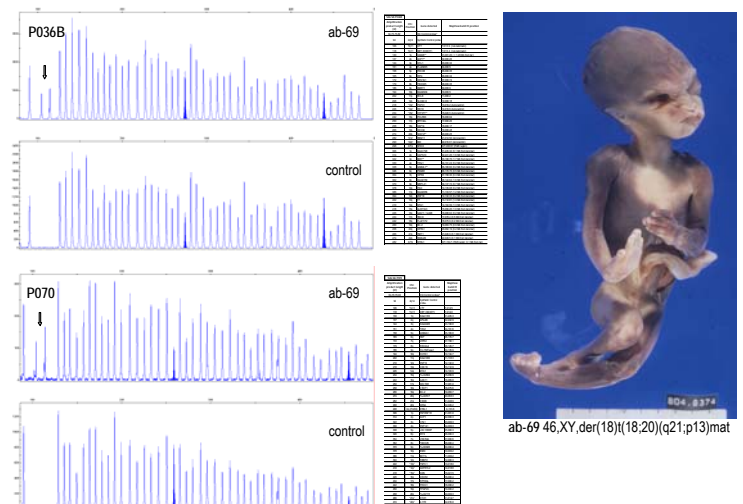


Figure 2: electropherograms of ab-69 [46,XY,der(18)t(18;20)(q21;p13)mat] against a normal female control showing MLPA amplification products for P036B and P070 probe-mixes. Arrows indicate Y chromosome specific probes. Shadowed peaks in P036B correspond to 20p and 18q probes; shadowed peaks in P070 correspond to 18q and 20p probes.

## CONCLUSIONS

We propose MLPA technique with subtelomeric probe-mixes as a first and rapid approach to detect aneuploidies and unbalanced structural rearrangements in spontaneous miscarriages and specially for those cases in which cytogenetic result can not be obtained.

It is recommended to use both probe-mixes before concluding any result.

Nevertheless, polymorphisms in copy number are frequent and results should be confirmed with other techniques (microsatellite analysis by QF-PCR, FISH, CGH).

Employed together with QF-PCR, MLPA could improve detection rate of abnormalities such as aneuploidy triploidy and unbalanced terminal chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages.

## Acknowledgements:

Anatomopathologic and Obstetrics and Gynecology services of FJD for its appreciate collaboration and supporting. Dan Diego Alvarez is sponsored by "Fundación Conchita Rabago de Jiménez Díaz". This research was supported by a grant from F.I.S. (05/0263).

# PARENTAL ORIGIN IN RECURRENT TRISOMIC ABORTIONS



I. Lorda-Sanchez, D. Diego-Alvarez, R Cardero, M. Maiques, J. Diaz-Recasens, M. Rodríguez de Alba, C. Ramos

Servicio de Genética y Servicio de Ginecología, Fundación Jimenez Diaz, Madrid. [llorda@fjd.es](mailto:llorda@fjd.es)

## INTRODUCTION

**SPONTANEOUS ABORTIONS (SAs)** occur in 10-15% of clinically recognised pregnancies.

More than 60% of the SAs in the 1st trimester have an abnormal karyotype, most of them, trisomic

### RECURRENT MISCARRIAGE (RM)

- Affects up to 3% of couples trying to have children.

- The frequency of aneuploidy in RM varies between different studies and has been associated: to maternal age, parental gonadal mosaicism, variations in genes involved in recombination or environmental exposures.

We have found **7 cases** of recurrent fetal aneuploidies among 14 cases of RM in which at least two abortions were cytogenetically studied

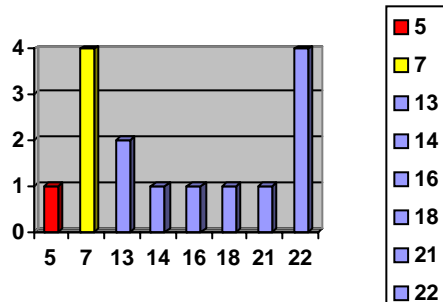
	1st tris	origin	2 <sup>nd</sup> tris	origin	3 <sup>rd</sup> tris	Gestations	Secondary sterility	Mat/Pat age
A	47,XY,+7		47,XX,+22		47,XX,+22	G6/P2/A4	present	35/37; 39/41; 41/43
I	47,XX,+13		47,XX,+14			G4/P0/A4	present	36/--; 37/--
MM	47,XX,+22	M-I	47,XX,+7	M-I		G3/P1/A2		32/32; 33/33
MC	47,XX,+21	P-II/Mi	47,XX,+22	M-I		G2/P0/A2	present	33/39; 34/40
N	47,XX,+13	M-I	47,XX,+5	M-II		G4/P0/A4	present	33/34; 33/35
Y	47,XX,+16	M-I	47,XY,+7	M-I		G6/P1/A5		39/40; 40/41
IN	47,XY,+7	P-II/Mi	47,XX,+18	M-II		G2/P0/A2		30/--; 31/--

## TYPES OF ABNORMALITIES

-Heterotrisomy was found in all cases, discarding gonadal mosaicisms.

- Common trisomies found in other studies of SAs like tris 15 and 16 were underrepresented, while tris 7 was over-represented.

-We found also uncommon trisomies like tris 5.



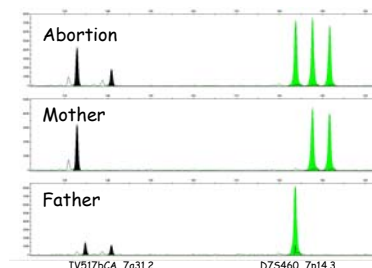
## PARENTAL AGES

The mean maternal age ( $34 \pm 2,7$ ) is lower than the maternal age found in single trisomy cases in our cohort of patients ( $36.6 \pm 4.3$ ;  $n=66$ ) (not statistically significant) and 4 out of 7 were <34 years old, suggesting that other factors than the increased maternal age could be related to recurrent trisomies in SAs.

## PARENTAL ORIGIN/ NONDISJUNCTION EVENT

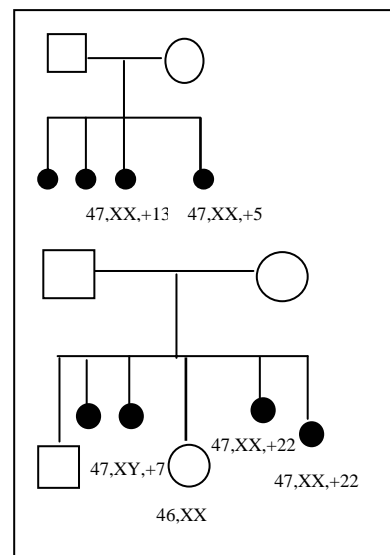
When parental DNA was available, QF-PCR was performed in order to assess parental origin and stage of error of aneuploidy. Almost all trisomies arose in maternal meiosis I.

In two cases, the origin was paternal or mitotic in the first trisomy and maternal in the second one, suggesting the possibility of an inherited predisposition to nondisjunction.



## REPRODUCTIVE HISTORY

In four couples at least 4 miscarriages were detected. Periods of secondary sterility were described in three couples, which could represent also very early pregnancy losses.



## CONCLUSIONS

**Other mechanism** apart from gonadal mosaicism and those related to maternal age, like hormonal imbalances, genes involved in recombination events or environmental exposures might predispose to recurrent trisomic abortions.

Acknowledgements: This research was supported by a grant from F.I.S (05/0263) Dan Diego Alvarez is sponsored by Fundacion Conchita Rabago de FJD



# USE OF THE MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) AS A COMPLEMENTARY TECHNIQUE FOR THE ASSESMENT OF A STRUCTURAL CHROMOSOMAL MOSAICISM IN PRENATAL DIAGNOSIS

M. Rodriguez de Alba, D. Diego-Alvarez, \*J. Plaza-Arranz, A. Bustamante-Aragonés, C. Sanchez-Jimeno, F. Infantes, C. Ayuso, C. Ramos  
Genetics and \*Obstetrics and Gynecology Departments. Fundacion Jimenez Diaz, Madrid, Spain.

mrodrigueza@fjd.es

## INTRODUCTION

The presence of a structural chromosomal mosaicism in prenatal diagnosis is a rare event that may represent a major diagnostic problem since they most often occur during cell culture. However, in some cases this mosaicism is confined to the placenta or a true foetal one, so further studies are needed in order to give the proper genetic counselling. The general rule in those cases is to perform a high-resolution ultrasound and to ask for a **cord blood** and/or a new **amniotic fluid (AF)** sample for the study of the foetal karyotype. Besides, the use of the **fluorescence in situ hybridisation (FISH)** has been widely described as a complementary tool to confirm and better establish the rearrangement as well as to ascertain the percentage of each cell line. In the same way, it is used for the study of the new foetal samples obtained after the primary diagnosis.

However, at present new emerging molecular techniques are also being applied to the prenatal diagnosis field. These include the quantitative fluorescent PCR (QF-PCR) and **multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)**.

Here we propose the use of a new molecular technique, as the **MLPA**, for the assessment of structural chromosomal mosaicisms.

## CASE REPORT

We describe a case of a pregnant woman who underwent an **amniocentesis** due to maternal age. At that time the fetus had no apparent sonographic markers. The karyotype resulted to be 46,XX (35%)/46,XXr(22)(p11;q13.1)(65%).

Once the presence of the mosaicism was diagnosed, and confirmed by **FISH** with the use of the Di George probe (QBIO-gene), the couple was suggested a **cordocentesis** in order to confirm the results.

The cytogenetic analysis of the **fetal cord blood** confirmed the presence of the mosaicism. The percentage of both cell lines in this tissue was 50%.

In **parallel** to **cord blood culture**, **MLPA** technique with subtelomeric probes was performed in order to test its accuracy in the assesment of terminal deletions/duplications for this kind of diagnosis. To discard the occurrence of the event during cell culture, **DNA** samples from both the **original AF sample** and **culture** were analysed. The structural chromosomal mosaicism was detected in both samples using MLPA.

## DISCUSSION

The discovery of structural chromosomal mosaicisms in prenatal diagnosis may represent a major diagnostic problem due to the possibility of being a cell culture artefact, a confined placental mosaicism or a true foetal mosaicism. According to the guidelines for the diagnosis of chromosome mosaicism in amniocytes, the first step is the study of several culture flask looking for the abnormal cell line. To confirm the results and to give a proper genetic counselling further studies are needed. These may include a new amniocentesis and/or cordocentesis, FISH an a high resolution ultrasound.

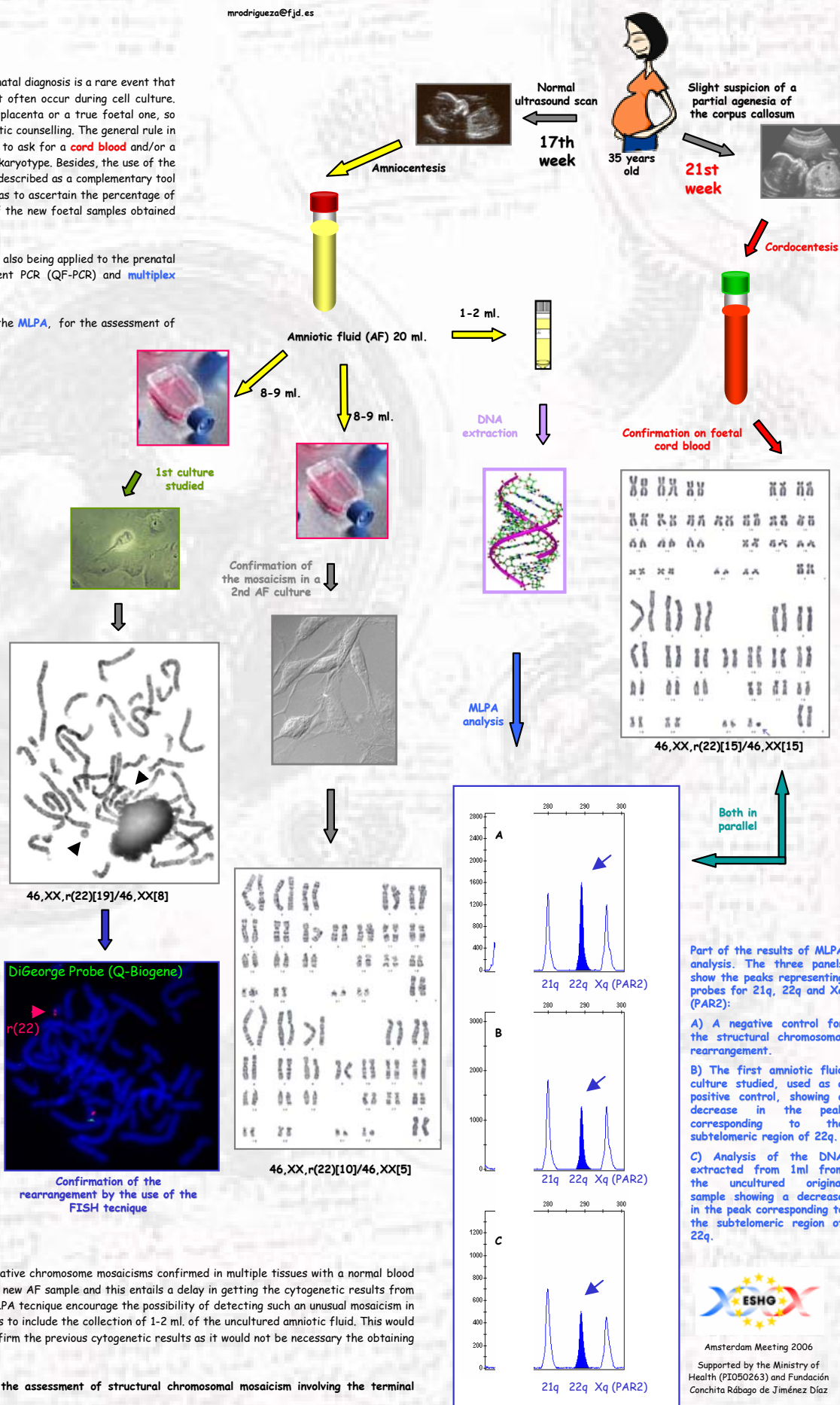
We have already experienced the accuracy of the technique in detecting numerical chromosomal abnormalities as well as terminal deletions derived from an unbalanced segregation of a translocation. For this reason we decided to test the technique in order to know its accuracy in detecting a mosaic of a terminal deletion.

We have proved that using the proper positive and negative controls, the technique is good enough to confirm a previously seen structural chromosomal mosaicism.

The cytogenetic study in foetal blood offers an additional approach to the ascertainment of the foetal karyotype with the additional advantage of a culture requirement of just 72 hours.

However, it has also been described the existence of derivative chromosome mosaicisms confirmed in multiple tissues with a normal blood karyotype. These cases make it desirable the obtaining of a new AF sample and this entails a delay in getting the cytogenetic results from the culture. The results obtained in this report with the MLPA technique encourage the possibility of detecting such an unusual mosaicism in a unique AF sample. For this purpose the working routine has to include the collection of 1-2 ml. of the uncultured amniotic fluid. This would represent a remarkable decrease in the time needed to confirm the previous cytogenetic results as it would not be necessary the obtaining of a new sample.

The **MLPA** technique has shown to be a good tool for the assessment of structural chromosomal mosaicism involving the terminal deletion of a chromosome.





# Estudio de anomalías cromosómicas en abortos espontáneos: de la citogenética clásica a la genética molecular



Diego-Alvarez D<sup>1</sup>, Ramos C<sup>1</sup>, Díaz-Recasens J<sup>2</sup>, Cardero-Merlo R<sup>1</sup>, Rodríguez de Alba M<sup>1</sup>, Trujillo-Tiebas MJ<sup>1</sup>, Gonzalez-Gonzalez C<sup>1</sup>, Ayuso C<sup>1</sup>, Lorda-Sanchez I<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Servicio de Genética; <sup>2</sup>Servicio de Obstetricia y Ginecología; Fundación Jiménez Díaz - Madrid

Correspondencia: Dan Diego Alvarez (ddiego@fjd.es)



## INTRODUCCIÓN

El **aborto espontáneo** acontece en ~15% de las gestaciones clínicamente reconocidas (Miller *et al.*, 1980), siendo las **anomalías cromosómicas** responsables de más del **60%** de las pérdidas durante el primer trimestre de gestación (Hassold *et al.*, 1980).

El **diagnóstico** en la causa de la interrupción del embarazo reduce significativamente tanto el estrés psicológico a largo plazo como el sentimiento de culpabilidad generado en la mujer tras sufrir un aborto (Nikcevic *et al.*, 1999), además de permitir ofrecer un adecuado **consejo genético** a estas parejas de cara a futuros embarazos (Carp *et al.*, 2001).

El **estudio citogenético** de los restos abortivos presenta ciertas limitaciones: elevada tasa de **fallo del cultivo** celular (10-40%) (Lomax *et al.*, 2000), contaminación microbiana de éste y obtención de fasos cariotipos normales femeninos por **contaminación** celular de **origen materno**. Asimismo, algunos autores sostienen la hipótesis de que el cultivo celular pueda dar lugar a cariotipos normales o a aquellos pocos anómalos que permitan la proliferación celular *in vitro*, sugiriendo que la frecuencia de anomalías cromosómicas no comúnmente observadas mediante técnicas citogenéticas podría ser superior a la descrita hasta el momento (Benkhalifa *et al.*, 2005).

El **objetivo** del presente estudio es presentar nuestra experiencia en el empleo de las técnicas de **QF-PCR** (*Quantitative Fluorescent - PCR*), **FISH** (*Fluorescent In Situ Hybridization*), **MLPA** (*Multiplex Ligation-dependent Amplification*) y **CGH** (*Comparative Genomic Hybridization*) para la detección de **anomalías cromosómicas** en restos abortivos como método complementario y paralelo al cariotipado convencional, valorando las ventajas y limitaciones de cada una y estableciendo el protocolo óptimo para el estudio de este tipo de muestras.



Figura 2: Aborto 47,XX,-21 de ocho semanas de gestación. (fotografía cedida por C. Gonzalez-Gonzalez).

## MATERIAL, MÉTODOS Y TÉCNICAS

**Muestras:** vellosidades coriales (figura 1), embrión (figura 2) o tejido placentario de 732 abortos espontáneos (6-24 semanas de gestación) obtenidos tras legado evacuador.

**Estudio citogenético:** cultivo de fibroblastos para análisis de cromosomas metafásicos (bandeo-G) o núcleos celulares (FISH en núcleos interfásicos empleada para validación de resultados) (figura 3) establecido en muestras no maceradas o fijadas (EtOH o formol).

**Estudios moleculares:** extracción de ADN a partir de ~100 mg de tejido (fresco, congelado o fijado) con el BioRobot EZ1 (QUIAGEN) y posterior empleo de las técnicas moleculares:

- Análisis de marcadores microsatélites de los cromosomas 13, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y en multiplex mediante QF-PCR (figura 4) para el estudio de aneuploidías, triploidia y descartar contaminación materna en la muestra.
- MLPA con sondas subteloméricas (SALSA P036B y P070) (figura 5) como rastreo de aneuploidías de todos los cromosomas y reordenamientos cromosómicos terminales desequilibrados (productos de translocación).
- CGH convencional (figura 6) en aquellas muestras en las que el cultivo celular no pudo ser establecido o fracasó, o para validar resultados obtenidos mediante las técnicas anteriores.

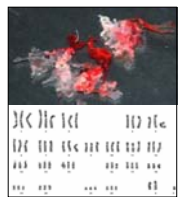
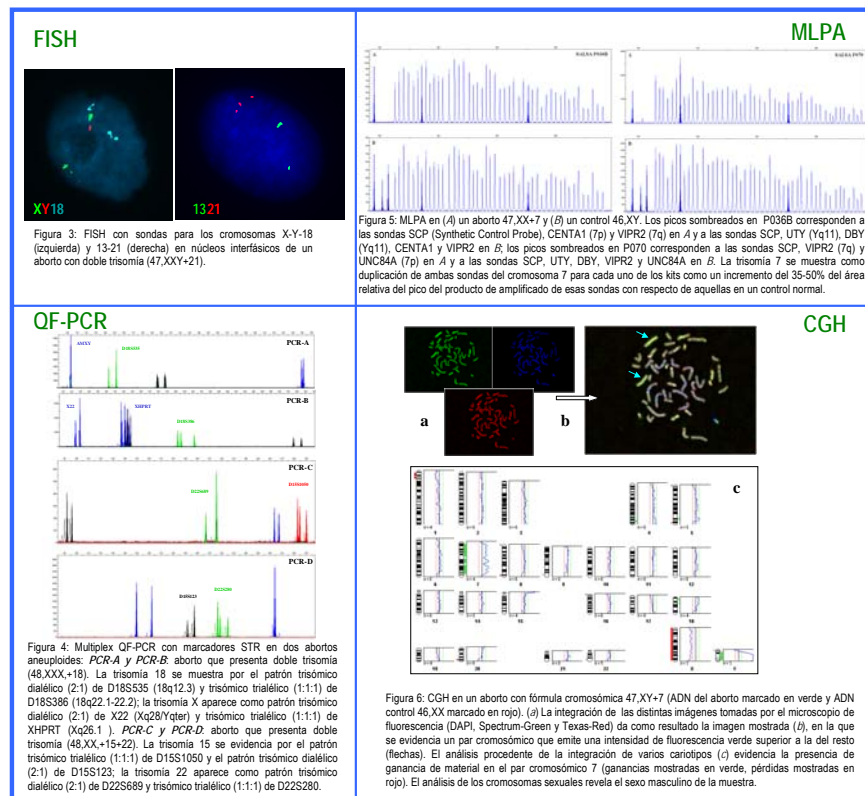


Figura 1: Aspecto de vellosidades coriales hidrópicas correspondientes a un aborto con dotación cromosómica triploide (69,XXY).



## COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS

	Cariotipo	FISH	QF-PCR	MLPA*	CGH
Requerimientos de la muestra:					
Viabilidad celular	Requerida	No necesaria*	No requerida	No requerida	No requerida
Medio de transporte / conservación	Esterilidad, fresco (solución salina)	Fresco	Independiente*	Independiente*	Independiente*
Anomalías numéricas:					
Aneuploidia	Detectable	Detectable	Detectable	Detectable	Detectable
Triploidia	Detectable	Detectable	Detectable	No detectable	No detectable
Tetraploidia	Detectable	Detectable	No detectable†	No detectable	No detectable
Anomalías estructurales:					
Translocaciones equilibradas	Detectables	Dirigida	No detectables	No detectables	No detectables
Translocaciones desequilibradas	Detectables	Dirigida	STRs dirigidos e informativos	Terminales	Detectables
Inversiones	Detectables	No detectables	No detectables	No detectables	No detectables
Duplicación segmentos cromosómicos	Detectable†	Dirigida	STRs dirigidos	Terminales	> 3 Mb
Delección segmentos cromosómicos	Detectable†	Dirigida	STRs dirigidos e informativos	Terminales	> 3 Mb
Anillos	Detectables	Dirigida*	Detectable†	Detectable	No detectable
Cromosomas marcadores	Detectables	Dirigida	Detectable†	No detectable	No detectable
Mosaicismo	Detectable	Detectable	Detectable†	Detectable†	Detectable†
Disomía uniparental (UPD):	No determinable*	No detectable	Detectable	No detectable	No detectable
Mola hidatidiforme:	No diagnóstico	No diagnóstico	Diagnoscible	No diagnóstico	No diagnóstico
Contaminación materna:	No detectable†	No detectable†	Detectable	No detectable	No detectable
Origen anomalía:					
Parental	No detectable	No detectable	Detectable	No detectable	No detectable
Meiósico / mitótico	No detectable	No detectable	Detectable	No detectable	No detectable
Tiempo requerido:					
Procesamiento	2-3 semanas	24-48 h	< 24 h	48 h	72 h
Análisis resultados	Alto	Moderado	Bajo	Moderado	Alto
Resolución:	Variable (500-900 bandas), todos los cromosomas	Limitada y dirigida*	Limitada, STRs dirigidos†	Regiones subteloméricas de todos los cromosomas	Genómica, > 3 Mb*
Coste (reactivos, fungible):	Moderado	Alto	Bajo	Bajo	Alto
Aparataje requerido:	Microscopio óptico	Microscopio fluorescencia	Termociclador, secuenciador automático	Termociclador, secuenciador automático	Microscopio fluorescencia

Tabla 1: Comparación de las distintas técnicas. \*Empleo de kits de sondas subteloméricas; a) FISH sobre núcleos interfásicos en células no cultivadas; b) Preferentemente en fresco o congelado, pero resultados aceptables en muestras fijadas durante un tiempo breve; c) No detectable si es causada por error de división del cigoto; si por fertilización trispermica del óvulo; d) Dependiente de la resolución en bandas y el tamaño de la anomalía; e) Dependiente de las sondas subteloméricas; f) Dependiente del cromosoma marcador; g) En función de la proporción de cada línea celular; h) Salvo excepciones (polimorfismos característicos en cromosomas parentales); i) Salvo que existan dos líneas celulares diferenciadas y se compruebe mediante análisis de marcadores microsatélites; j) Cada aplicación requiere de al menos un programa de software específico; k) Sondas específicas; multiplex de hasta cinco fluoróforos; inconveniente hibridación cruzada de algunas sondas centroméricas; l) Limitación del número máximo de marcadores por multiplex; m) Limitada en regiones centroméricas y teloméricas (secuencias repetidas).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El empleo de técnicas moleculares en nuestra colección de muestras ha permitido detectar **anomalías cromosómicas** (trisomía sencilla y doble, monosomía X, triploidia, deleciones terminales, productos desequilibrados de translocación) en abortos en los cuales el **cultivo fracasó** o no pudo ser establecido debido al avanzado estado de maceración de la muestra o a su transporte en medio inadecuado. Asimismo, el estudio de marcadores microsatélites permitió diagnosticar tres **molos hidatidiformes** completas (diploide, origen por duplicación de gameto masculino haploide) entre aquellos abortos con cariotipo 46,XX.

Basándonos en nuestra experiencia, recomendamos: **1)** un primer rastreo de triploidia y aneuploidías más frecuentes mediante QF-PCR a la vez que se descarta la contaminación materna de la muestra; **2)** un screening de aneuploidías de todos los cromosomas y productos desequilibrados derivados de translocación mediante MLPA con el empleo de kits de sondas subteloméricas; **3)** confirmación de los resultados obtenidos mediante análisis de microsatélites o FISH, descartando por lo general la técnica de CGH debido a su laboriosidad y elevado tiempo de análisis.

## CONCLUSIONES

El empleo de las **técnicas moleculares** en paralelo al estudio citogenético para la detección de anomalías cromosómicas en abortos espontáneos podría permitir un **diagnóstico más completo y refinado** y lo que es aún más importante, un diagnóstico en aquellos casos en los que el cultivo celular fracasó o no puede ser establecido.

## Agradecimientos:

A los Servicios de Obstetricia y Ginecología y Anatomía Patológica de la FJD por su apoyo y colaboración.

Dan Diego Alvarez recibe una ayuda de la "Fundación Conchita Rabago de Jiménez Díaz". Este proyecto está subvencionado por el F.I.S. (05/0263).

# Importancia del Estudio Cromosómico en Restos Abortivos

R.Cardero\*, M.A.López-Martínez\*, D.Diego-Álvarez, I.Lorda-Sánchez, M.Rodríguez de Alba, E.Vallespín-García, F.Infantes, C.Ramos  
Departamento de Genética de la Fundación Jiménez Díaz-Capio

\*Ambos autores han contribuido por igual en este trabajo

## INTRODUCCIÓN

Hay diversas causas de aborto espontáneo, pero la más frecuente es la presencia en el feto de cromosomopatías. Aproximadamente, el 60% de los abortos del primer trimestre tienen al menos una anomalía cromosómica, que en la mayoría de los casos es incompatible con la vida.

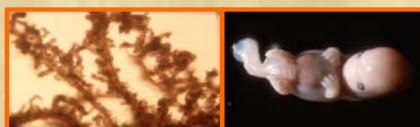
No obstante, el estudio citogenético de restos abortivos presenta algunas limitaciones: dificultad en la obtención y reconocimiento de la muestra para el cultivo, contaminación o maceración. También influye el transporte inadecuado (fijación alcohólica). Los restos abortivos no aptos para cultivo o con fallos en el crecimiento, se remiten para un estudio genético-molecular.

## MATERIAL

El estudio se realizó en un total de 302 abortos (Octubre 2002 – Octubre 2005), de los que sólo pudieron ser cultivados 216. El resto (86) se obtuvo el resultado por técnicas de genética molecular.

## METODOLOGÍA

Identificación y Selección del Material Fetal para Cultivo



Vellosidad Corial

Músculo o Piel

Extracción de ADN

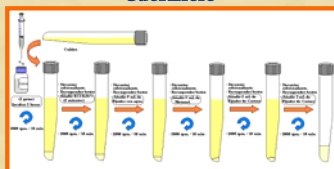


Lavado y Cultivo



Cultivo sin Crecer

Sacrificio



Bandeo de Cromosomas

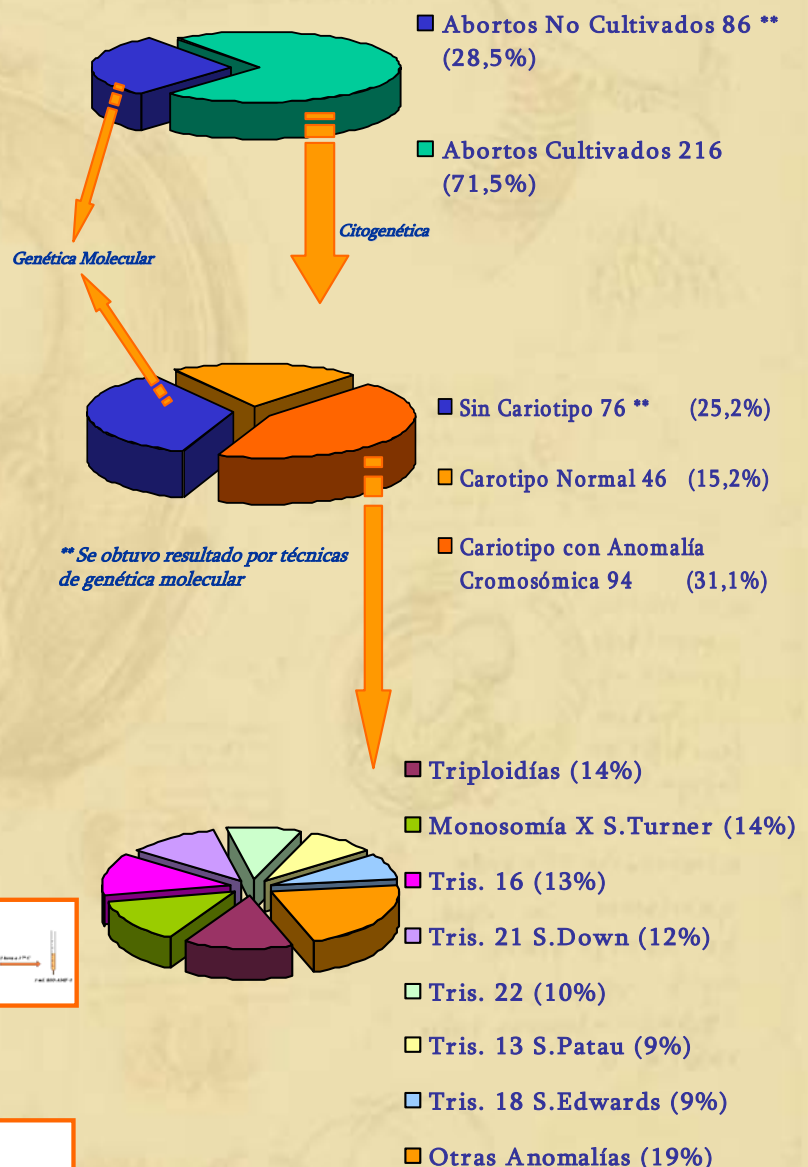
Microscopio



CGH



## RESULTADOS



## CONCLUSIONES

- La adecuada selección del material fetal permitió obtener un 65% de éxito de crecimiento en los cultivos para la obtención de un cariotipo fetal.
- Se encuentra un alto porcentaje de anomalías cromosómicas en los abortos con cariotipo (67%).
- Se ha observado un 68% de anomalías cromosómicas por técnicas de genética molecular.
- Se recomienda realizar un estudio genético molecular en aquellos casos de abortos con dificultad de crecimiento.
- El estudio citogenético del aborto permite ofrecer un apropiado consejo genético a la pareja.



# New molecular cytogenetic techniques: implications for genetic counselling of infertile couples

Diego-Alvarez D\*; Rodríguez de Alba M; Trujillo-Tiebas MJ; Vallespin E; Bustamante-Aragones A; Ramos C; Ayuso C; Lorda-Sanchez I.  
Genetics Service - Fundación Jiménez Díaz (Spain)

\*To whom correspondence should be addressed: Dan Diego Álvarez (ddiego@fjd.es)



## INTRODUCTION

Embryo loss represents around 15% of clinically recognized pregnancies (Miller *et al.*, 1980). Among presumptive causes of pregnancy loss, **chromosomal anomalies** account for more than 50% of **first trimester spontaneous abortions (SAs)** (Hassold *et al.*, 1980).

Identification of the **cause** of fetal loss significantly **reduces** long-term **psychological distress** and self-blame feelings in women with a miscarriage (Nikcevic *et al.*, 1999) and **enables** offering a proper **genetic counselling** to these couples in subsequent pregnancies.

Routine **cytogenetic** study of miscarriages entail high rates of **culture failure**, **misdiagnosis** due to overgrowth of maternal cells over fetal ones and **suboptimal quality** of chromosome **preparations**. Moreover, some authors support the **hypothesis** that cell culture may yield normal karyotypes or selected abnormal ones that allow *in vitro* cell proliferation, suggesting that rates of **abnormalities** uncommonly seen by conventional cytogenetics may be **more frequent** than the reported ones (Benkhalifa *et al.*, 2005).

The recent incorporation of **molecular cytogenetic techniques** to the study of chromosomal anomalies in spontaneous miscarriages has allowed to establish a diagnosis in some of those cases in which karyotyping is not possible (culture failure or inappropriate state of the sample). Moreover, a **normal karyotype** could hide **subtle anomalies** detectable by molecular techniques (Shimokawa *et al.*, 2006).

Here, we present the case of a first trimester SA (9th week of gestation) karyotyped as **45,X** in which the later employment of **molecular techniques** gave rise to **additional findings**.

## REPORTED CASE

It was the **first abortion** of an unrelated couple (34 and 33 years old at the time of miscarriage) after the delivery of a healthy girl (figure 1).

At the time in which additional findings on chromosomal constitution of the abortion were observed, the woman had become pregnant again (LMP date: february 5, 2006).

No information about the progress of the **present pregnancy** is available.

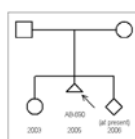


Figure 1: Family tree.

## MATERIAL AND METHODS

**Chorion villi** were obtained after surgical evacuation of POC and were cultured for **karyotyping**.

Part of the same material was used for **DNA isolation** in order to perform molecular studies (screening of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements by QF-PCR and MLPA with P036B (figure 4) and P070 subtelomeric probe-mixes) as routine work in our lab.

FISH (X-centromeric probe, DYZ1, DYZ3 and SRY complementary region probes) and Y chromosome specific sequences analysis by PCR were also performed.

## RESULTS

Conventional **cytogenetic** results concluded a **45,X** karyotype (figure 2).

Later, **molecular** studies suggested the **presence** of **Y chromosome** specific sequences on the abortion DNA: amelogenin Y chromosome specific amplification product by QF-PCR (figure 3) and amplification of UTY and DDX3Y probes by MLPA.

FISH analysis confirmed the existence of only one X chromosome but showed also the presence of the SRY region (figure 5) and the absence of the centromeric region of Y chromosome. Unfortunately, metaphases quality was not good enough to identify the chromosome in which the SRY region lied.

Besides, PCR confirmed the presence of the SRY region. Azoospermia region AZFa was also present, but AZFb and AZFc were not (figures 6 and 7).

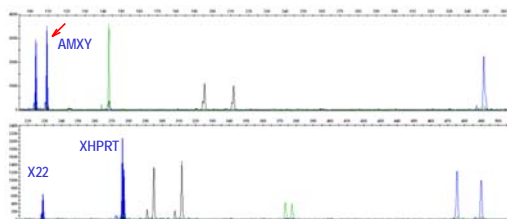


Figure 3: Multiplex QF-PCR showing the presence of amelogenin (Xp22.1-22.3/Yp11.2) X and Y (arrow) amplification products.

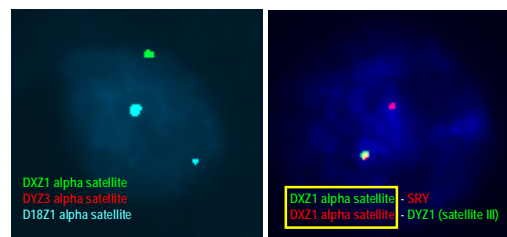


Figure 5: Left: Interphase nuclei FISH showing the presence of one signal for X-centromere region (green), two signals for chromosome 18 centromere (blue) and none for Y-centromere. Right: Nuclei were simultaneously hybridized with two double probes after discarding the presence of Y-centromere region. FISH images show the presence of one X-centromere (yellow) and one SRY signal (red).

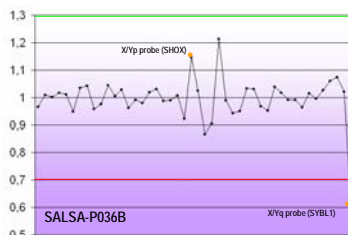


Figure 4: MLPA analysis after normalization of data showing deletion of SYBL1 probe (X/Yq) but not of SHOX probe (X/Yp), which would be expected in 45,X cases.

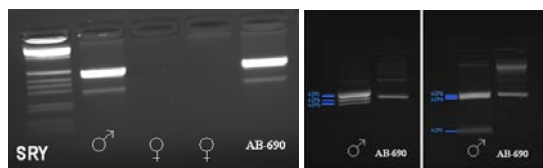


Figure 6: PCR analysis confirmed the presence of SRY in the abortion DNA sample (left) and moreover, the presence of the azoospermia region AZFa but not the AZFb and AZFc ones (right).



Figure 2: Karyotype of AB-690: 45,X

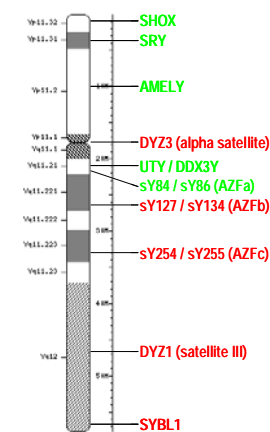


Figure 7: Y chromosome ideogram showing the detected (green) or not (red) sequences in AB-690.

## DISCUSSION

Cytogenetic study concluded a **45,X** karyotype for AB-690. Since near 80% of Turner syndrome cases are paternal in origin and recurrence risk is not high (excluding 45,X/46,XX or 45,X/46,XY mosaics in the parents), the couple was informed and properly counselled. Later, molecular studies suggested the presence of Y chromosome sequences on the abortion.

The results obtained demonstrate that the use of **molecular cytogenetic** techniques employed together with cytogenetic ones to the study of miscarriages could offer a more **accurate diagnosis**. Moreover, **subtle chromosome anomalies** could be detected in near 5% of "normal" karyotyped first trimester SAs, as recently described by Shimokawa *et al.* (2006). This situation may complicate **genetic counselling** either because of the still not well known importance or repercussion of cryptic chromosomal changes (i.e. copy number variation of genomic sequences) and the understanding of this situation by the couple and the subsequent anxiety that may be generated.

Regarding the present case, **array CGH** will be performed over this sample as soon as possible. Although parents should be requested for cytogenetic analyses in order to confirm the results and understand the complexity and origin of the abnormality, the advanced state of the still in course pregnancy and the anxiety that it will probably generate raise an **ethical conflict**.

## CONCLUSIONS

Due to the limitations that cytogenetic study of SAs encompasses and to the fact that subtle chromosomal anomalies may be present in near 5% of "normal" karyotyped specimens, **molecular cytogenetic** techniques employed together with cytogenetic ones could give rise to a more **refined** and **accurate diagnosis**.

Nevertheless, the **information** obtained may **not** be always **easy to interpret**, which might complicate in some cases a proper genetic counselling.

## References:

- Benkhalifa *et al.* (2005) Array CGH profiling of first trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro. Prenat Diagn 25(10):894-900.
- Hassold *et al.* (1980) A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. Ann Hum Genet 44(Pt 2):151-78.
- Miller *et al.* (1980) Fetal loss after implantation. A prospective study. Lancet 2(8194):554-6.
- Nikcevic *et al.* (1999) Investigation of the cause of miscarriage and its influence on women's psychological distress. Br J Obstet Gynaecol 106(8):808-13.
- Shimokawa *et al.* (2006) Array CGH analysis in first-trimester spontaneous abortions with "normal" karyotypes. Am J Med Genet Part A 140A: 1931-5.

## Acknowledgments:

Obstetrics and Gynecology service of FJD for its appreciated supporting and collaboration.  
Dan Diego Alvarez, Elena Vallespin Garcia and Ana Bustamante Aragones are sponsored by "Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz". This research was supported by a grant from F.I.S. (PI05/0263).





# Rapid diagnosis of hydatidiform moles by QF-PCR

Diego-Alvarez D<sup>1</sup>; Narvaiza RC<sup>1</sup>; Avila-Fernandez A<sup>1</sup>; Ramos C<sup>1</sup>; Cardero-Merlo R<sup>1</sup>; Trujillo-Tiebas MJ<sup>1</sup>; Diaz-Recasens J<sup>2</sup>; Aneiros J<sup>3</sup>; Lorda-Sanchez I<sup>1</sup>

**ciberer**  
Centre for Biomedical  
Research on Rare Diseases

(1) Genetics Service – CIBERER, (2) Obstetrics and Gynaecology Service and (3) Anatomopathological Service  
Fundación Jiménez Díaz (Spain)

To whom correspondence should be addressed: [ddiego@fjd.es](mailto:ddiego@fjd.es)



## INTRODUCTION

One possible cause of first trimester miscarriage is hydatidiform **molar pregnancy** (incidence ranges from 1/250 to 1/1000 pregnancies among ethnic groups), which is associated with a significantly increased risk of subsequent development of persistent gestational trophoblastic disease (GTD). Differentiating between **partial** (PHM) and **complete** (CHM) mole (*figure 2*) is important because of their different prognosis and appropriate treatment. While ~20% of patients with CHM develop a persistent trophoblastic tumour, PHM has a lower malignancy potential and although in both situations  $\beta$ -hCG levels should be monitored after evacuation, chemotherapy is needed in a large proportion of women with CHM.

Traditionally, diagnosis of hydatidiform moles has been relegated to **histopathologic** analyses. However, the widespread use of **ultrasound** in the clinical management of pregnancies has resulted in earlier detection and evacuation of abnormal pregnancies, including molar ones, which makes the histopathologic diagnosis that is based on subtle morphologic criteria more difficult to achieve.

Other approaches seem to be reliable diagnostic methods. Hence, karyotyping, flow cytometry or FISH may result useful in order to determine **ploidy** in hydatidiform moles. Nevertheless, **misclassification** of moles can occur particularly if no fresh tissue is available or if abundant tissue of maternal origin is present. Moreover, ploidy analysis by FISH or flow cytometry can not be used to distinguish a diploid mole from spontaneous abortion which can also show hypodiploid changes and trophoblast hyperplasia mimicking hydatidiform mole.

In contrast, classification of moles based on their **genetic constitution** and **parental origin** can be correctly assessed by PCR-based methods requiring only a small amount of DNA isolated from both fresh or paraffin-embedded tissue samples. Here, we present the molecular genetic study of complete and partial hydatidiform moles performed by multiplex QF-PCR with different chromosome specific polymorphic STR markers as a **novel diagnostic method** of hydatidiform moles.



Figure 1: D&C remains from a first trimester gestation showing cystic and hydropic villi.

## MATERIAL AND METHODS

From late 2005 onwards, 475 first trimester curettage samples were provided by the gynaecological service of the hospital (whether suspicion of mole existed or not) in order to assess its chromosomal constitution, and then were derived for anatomopathologic studies. **Chorionic villi** were preferentially employed for genetic studies (*figure 1*).

In order to perform **cytogenetic** studies, cell culture was attempted in all of the cases. In addition, **DNA** from all of the samples was isolated with the Tissue Kit for the BioRobot EZ1 (QIAGEN) after dissection of 10-15 mg of tissue and digestion with proteinase K at 56°C during 48-72 h following supplied protocols.

Two multiplex QF-PCR assays containing STR markers for chromosomes 13, 18, 21, X and Y were performed in all of the samples as described elsewhere in detail.

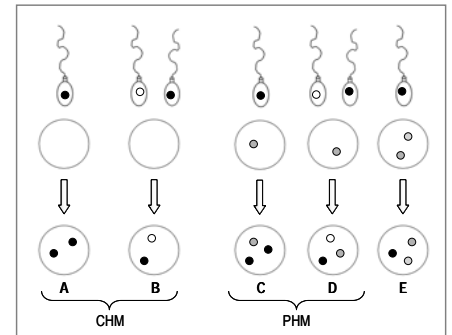


Figure 2: Mechanisms of formation of hydatidiform moles.

## RESULTS AND DISCUSSION

Three out of the 475 samples were diagnosed as homozygous CHM (ab-608, ab-810 and ab-962, *figure 3*). Two out of 475 were diandric triploid PHM (ab-604 and ab-758, *figure 4*). Two CHM were misdiagnosed as PHM by anatomopathologic examinations. Nonetheless, a histopathologically diagnosed CHM was genetically misdiagnosed, most likely being a heterozygous 46,XX mole (ab-553). In this case, a maternal DNA sample would have been necessary to establish a correct diagnosis.

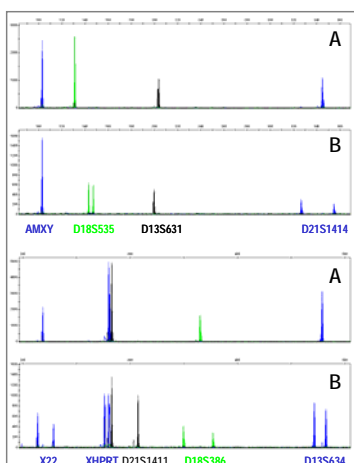


Figure 3: Electropherograms show multiplex QF-PCR assays in (A) chorionic villi DNA sample (ab-608) and (B) maternal DNA. A homozygous pattern of amplification is observed for every STR marker in the villus sample. Moreover, the majority of markers show no concordance with maternal inheritance. Results are consistent with a **homozygous CHM**.

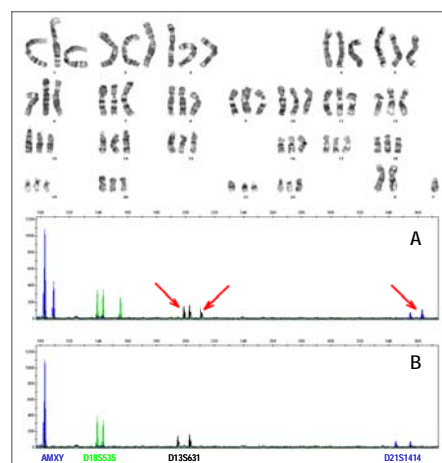


Figure 4: Electropherograms show multiplex QF-PCR assays in (A) chorionic villi DNA (ab-604) and (B) maternal DNA. A triploid pattern is assumed because a trisomic pattern (either di- or triallelic) is observed for every STR marker in the villus sample. Arrows indicate the paternal alleles for informative markers. Molecular and cytogenetic results are consistent with a **diandric PHM 69,XXY**.

**Complete Hydatidiform Mole (CHM)**  $\Rightarrow$  (A) Monospermic or homozygous mole (46,XX) results from the fertilization of an empty oocyte (the ovum nucleus may be either absent or inactivated) by a haploid sperm (23,X or 23,Y) followed by duplication of the paternal chromosomes (75-80%). 46,YY moles have never been described probably because such condition is not viable. There is no evidence for another mechanism of formation involving fertilization through a diploid sperm due to nondisjunction at meiotic division. (B) Dispermic or heterozygous mole (46,XX or 46,XY) results from the fertilization of an empty egg by two haploid sperms (23,X or 23,Y) (20-25%).

**Partial Hydatidiform Mole (PHM)**  $\Rightarrow$  Partial mole is solely caused by diandric triploidy (C and D) as the parental origin of the extra chromosomes in a triploidy determines the phenotype and outcome of the fetus and placenta. While digynic triploidy (E) conveys fetal growth retardation and apparently normal placenta development, diandric triploidy shows a normal fetal growth but a molar placenta. Karyotype can be either 69,XXX, 69,XXY or rarely 69,XYY. PHM may arise through fertilization of a haploid oocyte by one spermatozoon which doubles its chromosomes after fertilization (C), or by two sperm (D).

## CONCLUSIONS

A prompt and **accurate** diagnosis would help management and treatment of women suffering a molar pregnancy, so a reliable diagnostic **method** is essential.

The **proposed** multiplex QF-PCR **assay** permits the diagnosis of CHM and PHM in a **rapid** (24-48 h) and **economical** test complementary to the subjective and more time-consuming histopathologic study.

In order to exclude the presence of a heterozygous CHM, maternal DNA should be requested when suspicion of molar pregnancy exists.

## REFERENCES

- Petitnat P *et al.* (2003) *Is genetic analysis useful in the routine management of hydatidiform mole?* Hum Reprod 18(2),243-49.
- Diego-Alvarez D *et al.* (2005) *Application of QF-PCR with STR markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages.* Hum Reprod 20(5),1235-43.
- Devriendt K (2005) *Hydatidiform mole and triploidy: the role of genomic imprinting in placental development.* Hum Reprod Updat 11(2),137-42.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to Diego Cantalapiedra for its English language revision. Dan Diego Álvarez is sponsored by "Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz". The present work has been supported by a grant from FIS (PI050263).

# Chromosomal constitution assessment of spontaneous miscarriages: cytogenetic and molecular approach



Diego-Alvarez D<sup>1</sup>, Ramos C<sup>1</sup>, Rodriguez de Alba M<sup>1</sup>, Trujillo-Tiebas MJ<sup>1</sup>, Bustamante-Aragones A<sup>1</sup>, Vallespin E<sup>1</sup>, Cardero-Merlo R<sup>1</sup>, Infantes F<sup>1</sup>, Diaz-Recasens J<sup>2</sup>, Lorda-Sanchez I<sup>1</sup>

**ciberer**  
Centre for Biomedical  
Research on Rare Diseases

(1) Genetics Service – CIBERER, (2) Obstetrics and Gynaecology Service  
Fundación Jiménez Díaz – Capió (Spain)

To whom correspondence should be addressed: [ddiego@fjd.es](mailto:ddiego@fjd.es)



## INTRODUCTION

Spontaneous **abortion** occurs in about **15%** of clinically recognized **pregnancies**, affecting near 25% of all women at least once in their lifetime. It has been demonstrated that knowing the cause of the miscarriage reduces **psychological distress** and self-blame feelings in women with a miscarriage and enables offering an appropriate **genetic counseling** to these couples.

Since the earlier surveys, cytogenetic studies have widely demonstrated that **chromosomal anomalies** account for no less than **60%** of first trimester losses. But routine **cytogenetic** study of miscarriages entails high rates of culture failure (10-40%) or misdiagnosis due to overgrowth of maternal cell contamination. Moreover, some authors support the **hypothesis** that cell cultures may yield normal karyotypes or selected abnormal ones that allow *in vitro* cell proliferation, suggesting that rates of abnormalities uncommonly seen by conventional cytogenetics may be more frequent than the reported ones.

In contrast to conventional cytogenetic techniques, molecular ones employ **DNA** instead of live tissue, which solves culture related limitations and permits the study of fixed and macerated specimens.

## MATERIAL AND METHODS

From 2003 onwards, we have performed molecular studies in **550 miscarriages** in addition to karyotyping. Molecular techniques included QF-PCR, CGH, MLPA with subtelomeric probes and array-based CGH. Results of these studies have been considered for the **evaluation** of molecular techniques.

## RESULTS

We present our **4 year** experience evaluating the **advantages**, possibilities and **limitations** of the mentioned techniques.



Figure 1: TOP at the 22nd week of monozygotic twins. Interphase nuclei FISH revealed mosaic tetraploidy in 65% of cells.

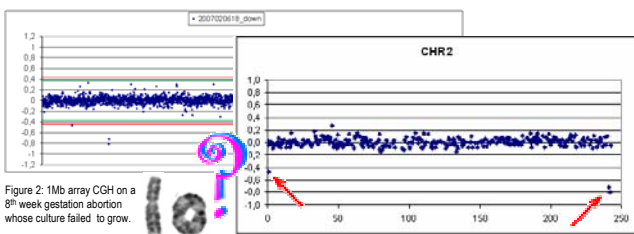


Figure 2: 1Mb array CGH on a 8th week gestation abortion whose culture failed to grow.

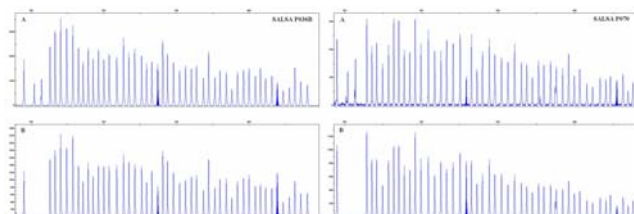


Figure 3: MLPA products for subtelomeric probe-mixes in (A) an abortion [46,XY,der(18)(18:20)(q21:p13)mat] and (B) a normal 46,XX control. Shadowed peaks in P0368 correspond to SOX12 (20p) and FLJ21172 (18q) probes; shadowed peaks in P070 correspond to CTD1P1 (18q) and FLJ22115 (20p) probes. Adjacent-1 segregation from maternal meiosis [46,XX,t(18:20)(q21:p13)] leads to a combination of partial monosomy 18q21-qter (del of 18q probes) and partial trisomy 20p13-pter (dup of 20p probes) in the zygote.

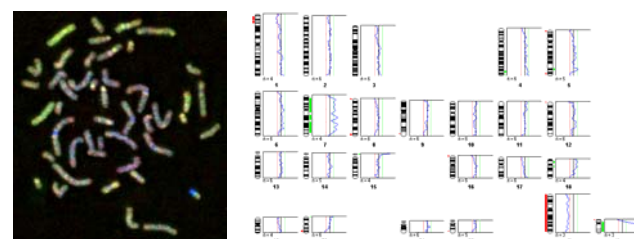


Figure 4: Conventional CGH reveals trisomy 7 (confirmed by QF-PCR and MLPA) in a 6th week gestation spontaneous abortion.

## DISCUSSION

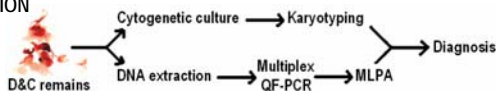


Figure 6: According to results and considering both cost/benefits and availability in a molecular laboratory, we proposed the present **protocol for the routine chromosomal study of spontaneous miscarriages**. After selection and washing of embryonic tissue (chorion villi, fetus, cord) in order to exclude maternal decidual remains from dilatation and curettage remains, material should be designated for both cytogenetic culture and karyotyping, and DNA extraction for molecular studies. These may include multiplex QF-PCR assay to discard triploidy, maternal DNA contamination and common aneuploidies. If ploidy changes are not observed, MLPA with subtelomeric probe-mixes should be performed in order to exclude aneuploidy for every chromosome and unbalanced terminal rearrangements. Although further studies are needed, the efficiency of expensive techniques like array CGH does not justify its routine use in the chromosomal study of miscarriages.

## ACKNOWLEDGEMENTS

My gratitude to **SEK**. Thanks to Diego Cantalapietra (FJD) for its English language revision and Laura Rodriguez (CIAC) for its suggestions regarding the present poster. Dan Diego Alvarez is sponsored by "Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz". The present work has been supported by a grant from FIS (PI050263).

	Karyotyping	FISH	QF-PCR	MLPA*	CGH	1 Mb array CGH
Sample requirements:						
Cellular viability	Required	Not necessary*	Not required	Not required	Not required	Not required
Conservation of the sample	Sterility and fresh tissue	Fresh	Independent†	Independent†	Independent†	Independent†
Numerical anomalies:						
Aneuploidy	Detectable	Detectable	Detectable	Detectable	Detectable	Detectable
Triploidy	Detectable	Detectable	Detectable	Non detectable	Non detectable	Non detectable
Tetraploidy	Detectable	Detectable	Non detectable†	Non detectable	Non detectable	Non detectable
Structural rearrangements:						
Balanced translocation	Detectable	Focused probes	Non detectable	Non detectable	Non detectable	Non detectable
Unbalanced translocation	Detectable	Focused probes	Specific and informative STR	Detectable	Detectable	Detectable
Inversion	Detectable	Focused probes	Non detectable	Non detectable	Non detectable	Non detectable
Segmental duplication	Detectable†	Focused	Specific and informative STR	Terminal	> 3 Mb	> 1 Mb
Segmental deletion	Detectable†	Focused	Specific and informative STR	Terminal	> 3 Mb	> 1 Mb
Ring chromosomes	Detectable	Focused†	Non detectable	Detectable	Detectable	Detectable
Microchromosomes	Detectable	Focused	Detectable†	Non detectable	Non detectable	Detectable
Mosaicism:	Detectable	Detectable	Detectable†	Detectable†	Detectable†	Detectable†
Uniparental disomy:	Non determinable†	Non detectable	Detectable	Non detectable	Non detectable	Non detectable
Maternal contamination of sample:	Non detectable	Non detectable	Detectable	Non detectable	Non detectable	Non detectable
Origin of the anomaly:						
Parental	Non detectable	Non detectable	Detectable	Non detectable	Non detectable	Non detectable
Meiotic / mitotic	Non detectable	Non detectable	Detectable	Non detectable	Non detectable	Non detectable
Time requirement:						
Handling and processing	2-4 weeks	24-48 h	< 24 h	48 h	72 h	72 h
Analysis of results	Time-consuming	Moderated	Low	Moderated	Time-consuming	Moderated
Resolution:	450-900 bands; all the chromosomes	Limited and focused	Limited†	Subtelomeric regions of every chromosome	Genome wide > 3 Mb/	Genome wide > 1 Mb
Automation:	Not possible	Possible	Possible	Possible	Not possible	Not possible
Costs (reagents)	Moderate	High	Low	Low	High	Highest
Specific equipment†:	Optical microscope	Fluorescence microscope	Thermal cycler, automatic sequencer	Thermal cycler, automatic sequencer	Fluorescence microscope	Nanodrop, fluorescence scanner

Table 1: Comparison of techniques. \*Subtelomeric probe-mixes; a) FISH over non cultured cells; b) Preferably fresh or frozen, but also ethanol fixed or paraffin-embedded tissues can be used; c) Not detectable by abnormal cleavage of the zygote; detectable if it is due to trispermic fertilization of the ovum; d) Depends on the band resolution pattern and the size of the anomaly; e) Deletion of subtelomeric probes; f) Depending on the marker chromosome; g) Depending on the proportion of the mosaic cell line; h) Only some exceptions (heteromorphisms in parental chromosomes); i) Except in the existence of two differentiable cell lines and tested by microsatellite analyses; j) Specific probes; up to five fluorochromes; inconvenience of cross-hybridization of some centromeric probes; k) Limited by the number of STR markers per multiplex assay; l) Limited in pericentromeric and telomeric regions (repeated sequences); m) Each application requires at least a specific software.

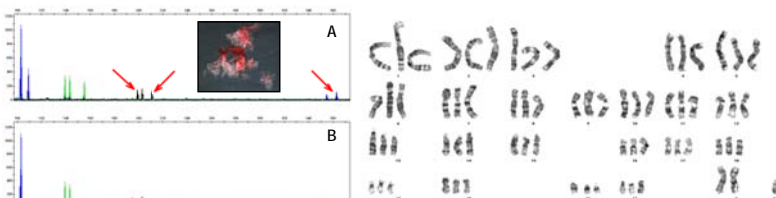


Figure 5: QF-PCR in (A) chorionic villi and (B) maternal DNA. Molecular, cytogenetic and histopathologic results are consistent with a diandric partial hydatidiform mole 69,XXY.

## CONCLUSION

The employment of **molecular techniques** for the chromosomal study of spontaneous miscarriages should be complementary to karyotyping in order to provide a more refined and complete **diagnosis** and, what is more important, a diagnosis of those cases in which cell culture cannot be established or fails to grow.

## REFERENCES

- Benkhaila *et al.* (2005) Array CGH profiling of first trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro. *Prenat Diagn* 25(10),894-900
- Diego-Alvarez *et al.* (2005) Application of QF-PCR with STR markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages. *Hum Reprod* 20(5),1235-43.
- Diego-Alvarez *et al.* (2007) MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages. *Prenat Diagn* (in press).
- Hassold *et al.* (1980) A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* 44(Pt 2),151-78.
- Nikovic *et al.* (1999) Investigation of the cause of miscarriage and its influence on women's psychological distress. *Br J Obstet Gynaecol* 106(8),808-13.





# Mosaicism and skewed inactivation of X-chromosome: its possible correlation to recurrent spontaneous abortions



Gutiérrez-Serrano M; Diego-Álvarez D; Rodríguez de Alba M; Cardero-Merlo R; Infantes F; Ramos C; Plaza-Arranz J<sup>2</sup>; Lorda-Sanchez I

Genetics Service-Fundación Jiménez Díaz-CIBERER (Spain), <sup>2</sup>Obstetrics and Gynecology Service-Fundación Jiménez Díaz (Spain)

## INTRODUCTION

Recurrent Spontaneous Abortion (RSA) is the interruption of two or more consecutive pregnancies. RSA occurs in 2-5% of couples. The causes of RSA are heterogeneous. Among all the described causes for spontaneous abortions, chromosomal disorders in the mother and fetus represent a 50-70%. Among 37-79% of couples do not receive an explanation for pregnancy loss. However the knowledge of the causes reduces psychological stress. Mosaicism and skewed inactivation of the X-chromosome have been associated with RSA. X-chromosome mosaicism has also been associated with abnormal reproductive outcome, such as primary or secondary amenorrhea, infertility and premature ovarian failure.

In a Chromosomal Mosaicism, at least two cell lines are present, one being normal and the other aneuploid (i.e. 45,X/46,XX or 46,XX/47,XXX) due to postzygotic errors as: 1) a non-disjunction, 2) late anaphase and 3) chromosomal rearrangement. Chromosomal Mosaicism is difficult to diagnose because, most of the cases, escapes detection. Detection techniques of mosaicism are Karyotyping (Figure 1A) and Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) (Figure 1B).

X-chromosome inactivation (XCI) is a natural process in female mammals. It starts in day 14<sup>th</sup> after fertilization and results in the inactivation of one of the two X-chromosomes in each cell (transcriptionally silenced) in order to achieve genetic dosage compensation with males. XCI is independent of parental origin (random inactivation) and when a cell decides which X-chromosome is inactivated, the descendant cells have the same pattern of inactivation. When inactivation is not at random, it is considered skewed XCI, and the parental derivatives are not inactivated in the same frequency (i.e. in X:Autosome translocations, mutations in one X-chromosome, sexual chromosomal mosaicism, or in peripheral blood of 5-20% of women). Skewed XCI increases with age and trisomic abortions have been described to be associated with skewed XCI. Detection techniques are based on DNA modification and Methylation Specific PCR assay (M-PCR).

## MATERIALS AND METHODS

**Samples:** peripheral blood from 146 women. Ninety-two had at least two miscarriages (women with RSA) (57 studied for FISH and for M-PCR, 27 only for FISH and 8 only for M-PCR) and 54 had at least one child, or several children and one abortion (controls) (25 studied for FISH and for M-PCR, 12 only for FISH and 17 only for M-PCR). One hundred and five women of the 146 had studied her karyotype.

### Methods:

- Karyotyping (G-Banding): lymphocytes culture to study the X-chromosome mosaicism. Twenty metaphases were examined (Figure 1A).

- FISH: with a centromeric X-chromosome probe (DXZ1). Two hundred nuclei were examined per patient (Figure 1B). The threshold was established at 2% of aneuploid cells to be considered mosaic women.

- M-PCR performed at the Androgen-Receptor gene (HUMARA) (Xq11-12) since methylation at this locus correlates with X-inactivation. A trinucleotide repeat (CAG) polymorphism located within the amplified region was used to distinguish between the two alleles. Women were considered to display skewed XCI pattern with more than 80% of one X-chromosome inactivated (Figure 2C and 2D). Monoallelic women (not informative) could not be employed for this purpose (Figure 2A and 2B).

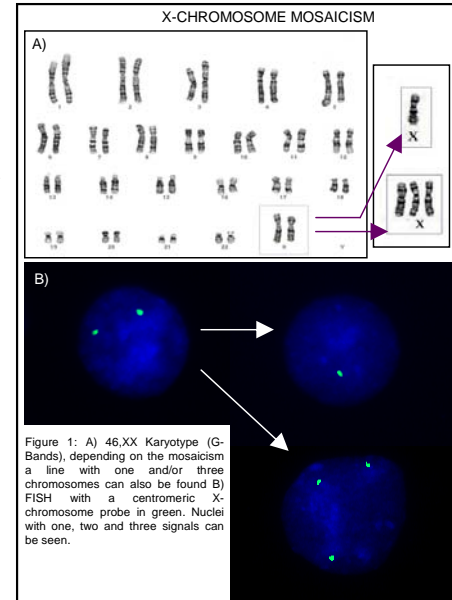


Figure 1: A) 46,XX Karyotype (G-Bands), depending on the mosaicism a line with one and/or three chromosomes can also be found B) FISH with a centromeric X-chromosome probe in green. Nuclei with one, two and three signals can be seen.

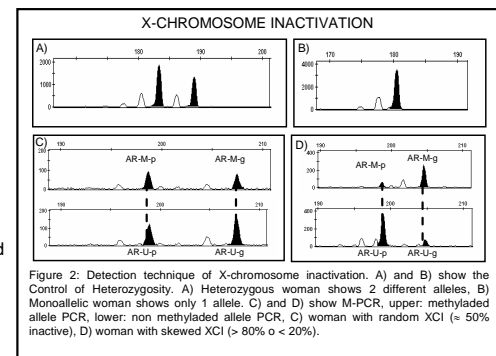


Figure 2: Detection technique of X-chromosome inactivation. A) and B) show the Control of Heterozygosity. A) Heterozygous woman shows 2 different alleles, B) Monoallelic woman shows only 1 allele. C) and D) show M-PCR, upper: methylated allele PCR, lower: non methylated allele PCR, C) woman with random XCI (~50% inactivated), D) woman with skewed XCI (>80% <20%).

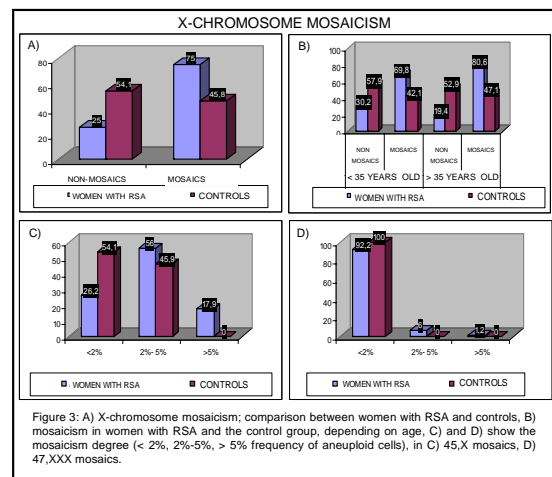


Figure 3: A) X-chromosome mosaicism; comparison between women with RSA and controls, B) mosaicism in women with RSA and the control group, depending on age, C) and D) show the mosaicism degree (< 2%, 2%-5%, > 5% frequency of aneuploid cells), in C) 45,X mosaics, D) 47,XXX mosaics.

## RESULTS

- karyotyping: all the women study for G-banding had normal karyotype.

- X-chromosome mosaicism (by FISH):

- There were significant differences in the presence of mosaicism between women with RSA and controls ( $p=0.003$ ) (Figure 3A).

- There were significant differences depending on age: women older than 35 years have more probability of displaying X-chromosome mosaicism and RSA ( $p=0.023$ ) (Figure 3B).

- Regarding X-chromosome mosaicism degree, significant differences were observed between the RSA and control groups in 45,X mosaic women ( $p=0.002$ ) (Figure 3C), but not in the 47,XXX mosaic group ( $p=0.249$ ) (Figure 3D).

- X-chromosome inactivation:

- There were not significant differences in the presence of skewed XCI between women with RSA and controls ( $p=0.787$ ) (Figure 4A).

- There were not significant differences depending on the age: women younger than 35 years old have the same probability of displaying skewed XCI and RSA than women older than 35 years old ( $p>0.05$ ) (Figure 4B).

- Regarding XCI degree, there were not significant differences between women with RSA and controls ( $p=0.987$ ).

- There are not relationship between mosaicism and inactivation of X-chromosome, neither in women with RSA, nor in controls ( $p=0.916$ ) (Figure 5).

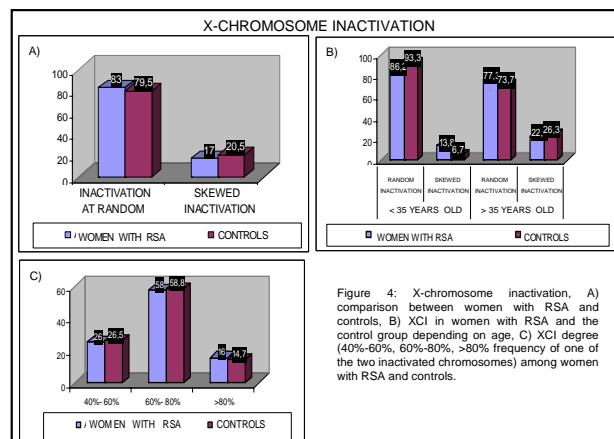


Figure 4: X-chromosome inactivation, A) comparison between women with RSA and controls, B) XCI in women with RSA and the control group depending on age, C) XCI degree (40%-60%, 60%-80%, >80% frequency of one of the two inactivated chromosomes) among women with RSA and controls.

## CONCLUSIONS

- The X-chromosome mosaicism is associated with RSA and this association is stronger in advanced maternal age.
- The X-chromosome mosaicism degree in 45,X mosaics is related with RSA, but not in 47,XXX mosaics.
- The skewed XCI is not associated neither with RSA nor with advanced maternal age.

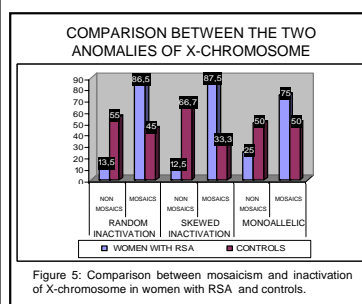


Figure 5: Comparison between mosaicism and inactivation of X-chromosome in women with RSA and controls.

- Mosaicism and skewed inactivation of X-chromosome are not related to one another.

Further studies might be done in order to establish:

- If the X-chromosome mosaicism is the cause of the RSA or the consequence of the unknown real cause of RSA.

- If the X-chromosome mosaicism is related to specific abortion anomalies (i.e. Trisomic abortion).

- If the study of X-chromosome mosaicism by FISH (not only karyotyping) can be incorporated to the protocol of women with RSA.

**ACKNOWLEDGEMENTS:** Thanks to Diego Cantalapiedra for its English language revision. The present work has been supported by a grant from FIS (PI050263).

# Nuevas técnicas moleculares en el estudio de anomalías cromosómicas en abortos espontáneos



Diego-Alvarez D<sup>1,3</sup>, Bustamante-Aragones A<sup>1</sup>, Cardero-Merlo R<sup>1</sup>, Rodríguez de Alba M<sup>1</sup>, Ramos C<sup>1</sup>, Vallespin E<sup>1</sup>, Infantes F<sup>1</sup>, Ayuso C<sup>1</sup>, Diaz-Recasens J<sup>2</sup>, Lorda-Sanchez I<sup>1</sup>



(1) Servicio de Genética – CIBERER, (2) Servicio de Obstetricia y Ginecología; Fundación Jiménez Díaz – Capió (Madrid)  
(3) Departamento de Biología Molecular y Celular; Facultad de Ciencias Experimentales; Universidad SEK-IE (Segovia)  
Correspondencia: [ddiego@fjd.es](mailto:ddiego@fjd.es)



## INTRODUCCIÓN

El aborto espontáneo acontece en un 15% de las gestaciones clínicamente reconocidas, siendo las anomalías cromosómicas responsables de más del 60% de las pérdidas que se producen durante el primer trimestre de gestación. Estudios poblacionales concluyen que una de cada cuatro mujeres sufrirá un aborto al menos una vez en su vida, constituyendo esta situación una de las causas más frecuentes de infertilidad en los países desarrollados. El diagnóstico de la causa del aborto reduce significativamente tanto el estrés psicológico a largo plazo como el sentimiento de culpabilidad y responsabilidad generado en la mujer tras sufrir un aborto, además de permitir ofrecer un adecuado consejo genético a estas parejas de cara a futuros embarazos.

El estudio citogenético de los restos abortivos presenta ciertas limitaciones como la elevada tasa de fallo del cultivo celular (10-40%), contaminación microbiana de éste, escasa calidad de las preparaciones obtenidas y obtención de fasos cariotípicos normales femeninos por contaminación celular de origen materno. Asimismo, algunos autores sostienen la hipótesis de que el cultivo celular pueda dar lugar a cariotípicos normales o a aquellos pocos anómalos que permitan la proliferación celular *in vitro*, sugiriendo que la frecuencia de anomalías cromosómicas no comúnmente observadas mediante técnicas citogenéticas podría ser superior a la descrita hasta el momento.

A la vista de tales limitaciones, se planteó la utilización y validación de nuevas técnicas moleculares para el estudio de alteraciones cromosómicas en abortos espontáneos. La principal ventaja de éstas es el empleo de ADN frente a los cultivos celulares, sin requerir por tanto la viabilidad del material objeto de estudio, lo que posibilita realizar el estudio cromosómico en muestras maceradas, fijadas en etanol, formol o incluso embebidas en parafina, además de en fresco o congeladas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Muestras:** vellosidades coriales, feto y/o tejido placentario de 983 abortos espontáneos o IVEs (6-24 semanas de gestación).

**Estudio citogenético:** cultivo celular para realización de cariotipo y/o FISH sobre núcleos interfásicos (validación de resultados) de las muestras no maceradas o fijadas (EtOH o formol).

**Estudios moleculares:** extracción de ADN a partir de ~10 mg de tejido (fresco, congelado o fijado) con el BioRobot EZ1 (QIAGEN) y posterior empleo de las técnicas moleculares:

- Análisis de marcadores STR de los cromosomas 13, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y en multiplex mediante QF-PCR  $\Rightarrow$  detección de aneuploidías, triploidía, molas hidatidiformes y posible contaminación materna de la muestra.
- MLPA con sondas subteloméricas (P036B y P070)  $\Rightarrow$  screening de aneuploidías y alteraciones terminales desequilibradas de todos los cromosomas.
- CGH convencional  $\Rightarrow$  (primera etapa del estudio) estudio de cambios en el número de copia de regiones de todo el genoma, en aquellas muestras en las que el cultivo celular no pudo ser establecido o fracasó, o para validar resultados obtenidos mediante las técnicas anteriores.
- 1Mb array CGH  $\Rightarrow$  (última etapa del estudio) determinación del tamaño de los desequilibrios, detección de cambios en el número de copia con resolución de 1Mb.

## RESULTADOS

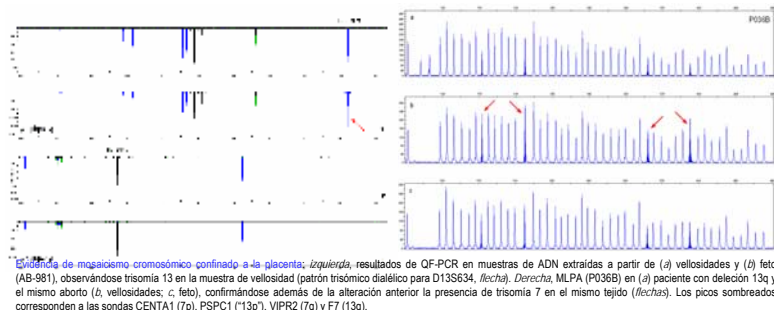


Figura 1. **Validación de mosaico cromosómico confinado a la placenta:** izquierda, resultados de QF-PCR en muestras de ADN extraídas a partir de (a) vellosidades y (b) feto (AB-981), observándose trisomía 13 en la muestra de vellosidad (patrón trisómico dialélico para D13S534, flecha). Derecha, MLPA (P036B) en (a) paciente con delección 13q y el mismo aborto (b, vellosidades; c, feto), confirmando además de la alteración anterior la presencia de trisomía 7 en el mismo tejido (flechas). Los picos sombreados corresponden a las sondas GATA1 (7p), PSPC1 (13p), VPR2 (7q) y F7 (13q).

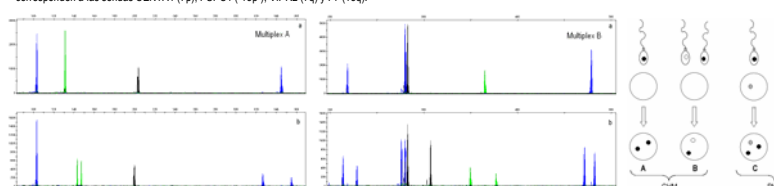


Figura 2. **Diagnóstico molecular de molas hidatidiformes:** izquierda, resultados de QF-PCR en ADN obtenido a partir de (a) vellosidades coriales y (b) decidua materna (AB-608). Los electroferogramas muestran un patrón de amplificado monoalélico para todos los marcadores cromosómicos en la muestra de vellosidad, incompatibilidad de algunos con herencia materna y ausencia de amplificado del fragmento de la amelogenina específico del cromosoma Y  $\Rightarrow$  observaciones compatibles con el diagnóstico de mola completa homocigota. Derecha, mecanismos de formación de las molas completas (CHM) y parciales (PHM).

## DISCUSIÓN

En base a la experiencia, los conocimientos adquiridos y los resultados obtenidos con las técnicas anteriormente descritas en el estudio de alteraciones cromosómicas en restos abortivos y, valorando la relación coste / beneficio (informatividad, fiabilidad y rapidez en la obtención de resultados), proponemos el siguiente protocolo para su estudio rutinario: tras la limpieza y correcta selección del tejido embrionario obtenido tras legrado (vellosidades coriales, feto o cordón umbilical) excluyendo los posibles restos de decidua materna, parte del material ha de ser destinado al cultivo citogenético para su posterior cariotipado y otra parte a la extracción de ADN para realizar los estudios moleculares paralelos en cada caso indicados. De manera general, estos deberían consistir en la realización de QF-PCR en multiplex como primera y rápida aproximación que permitirá descartar triploidía, contaminación materna y aneuploidías comunes. Si la calidad de la muestra así lo indica y no se observa poliploidía, debería realizarse MLPA con (ambos) kits de sondas subteloméricas para descartar tanto reordenamientos terminales desequilibrados como aneuploidías de todos los cromosomas. Los resultados obtenidos mediante las técnicas moleculares permiten detectar la mayor parte de las alteraciones cromosómicas frecuentes descritas en abortos espontáneos (a excepción de la tetraploidía, con una frecuencia estimada del 5% de entre todas las alteraciones). El análisis conjunto de éstas y el cariotipo (en aquellos casos en los que éste halla podido obtenerse) nos permitirá establecer un resultado en la mayoría de los casos. Aunque indicado en aquellos casos que presenten alteraciones estructurales o numéricas parciales para delimitar el tamaño y contenido génico de éstas, su elevado coste por el momento no justifica el empleo de array CGH para el estudio rutinario de todos los restos abortivos.

## CONCLUSIÓN

El empleo conjunto de técnicas moleculares para el estudio cromosómico de restos abortivos debería ser complementario al cariotipado, con objeto de obtener un diagnóstico más preciso y completo y lo que es más importante, un diagnóstico en aquellos casos en los que el cultivo citogenético fracasó o no puede ser establecido.

## BIBLIOGRAFÍA

- Benkhalifa et al. (2005) Array CGH profiling of first trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro. Prenat Diagn 25(10):894-900.
  - Diego-Alvarez et al. (2005) Application of QF-PCR with STR markers in the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages. Hum Reprod 20(5):1235-43.
  - Diego-Alvarez et al. (2007) MLPA as a screening method of aneuploidy and subtelomeric chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages. Prenat Diagn 27:765-71.
  - Hassold et al. (1990) A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. Ann Hum Genet 44(Pt 2):151-78.
  - Kucavcic et al. (1999) Investigation of the cause of miscarriage and its influence on women's psychological distress. Br J Obstet Gynaecol 106(8):808-13.
  - Rai & Reppert (2005) Recurrent miscarriage. Lancet 365:801-11.
- AGRADECIMIENTOS
- Mi más sincero agradecimiento a Rubén San Pablo, José Díaz y José Aneiros (Servicio Anatomía Patológica; FJD) por sus constantes favores; a Sara Álvarez (Unidad de Diagnóstico; CCM) por su amabilidad y paciencia; a María José Trujillo, Rosa Rivera, Ascensión Giménez, Almudena Avila, María García y Cristina González por su ánimo, apoyo, cariño y desinteresado interés en esta dura etapa; a Jesús Gómez (USEK) por haber confiado en mi brindándole la oportunidad de enseñar parte de lo aprendido; a la Fundación Conchita Rabago de Jiménez Díaz. Este trabajo ha sido financiado por el Fondo de Investigación Científica (PI050023).



IVE (AB-1091) por alteraciones cromosómicas en gestación de 20 semanas de un feto triploide (69,XXY) presentando fenotipo típico de origen digáunico: retraso asimétrico severo en el crecimiento que provoca que la cabeza presente un tamaño anormalmente superior con respecto al del cuerpo, ambigüedad genital, sindactilia (2º-3º dedo pie izquierdo y 3º-4º en pie derecho), labio leporino, paladar hendido y placenta extremadamente pequeña entre otras malformaciones.

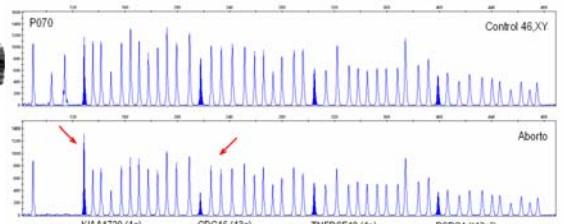


Figura 4. **Estudio de reordenamientos cromosómicos terminales MLPA (P070) en biopsia de vellosidades coriales** obtenida en gestación de 11 semanas interrumpida naturalmente (BC-3114) cuyo padre era portador conocido de una translocación [46,XY,t(1;13)(q31.2;q32)] (superior izquierda). Los electroferogramas muestran el producto desequilibrado de una segregación adyacente como duplicación de la sonda 1q (trisomía parcial) y delección de la sonda 13q (monosomía parcial, flechas). El resultado fue confirmado por QF-PCR (además de por el kit de MLPA P036C), pudiéndose establecer un diagnóstico mediante técnicas moleculares dentro de las 24 h siguientes a la realización de la biopsia.

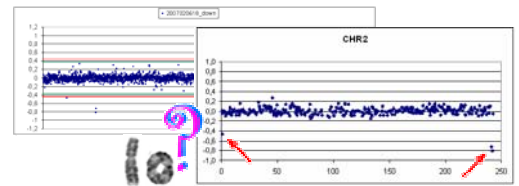


Figura 5. **Estudio de un aborto (AB-728) de 8 semanas, cuyo cultivo de vellosidades fracasó, mediante array CGH.** El gráfico muestra delección del clon GS1-8L3 (telómero G1) en 2p25.3 y de los clones adyacentes RP11-463B12 y RP11-556H17 en 2q37.3 (flechas). La interpretación de los resultados sugiere la posible presencia de un anillo cromosómico r(2).

ANEXO II

*"Application of quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages"*

Diego-Alvarez D, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, Gonzalez-Gonzalez C, Rodriguez de Alba M, Ayuso C, Ramos-Corrales C, Lorda-Sanchez I

*Hum Reprod* (2005) 20(5):1235-43

*"Trisomy 2 due to a 3:1 segregation in an abortion studied by QF-PCR and CGH"*

Lorda-Sanchez I, Diego-Alvarez D, Ayuso C, de Alba MR, Trujillo MJ, Ramos C

*Prenat Diagn* (2005) 25(10):934-8

*"Double trisomy in spontaneous miscarriages: cytogenetic and molecular approach"*

Diego-Alvarez D, Ramos-Corrales C, Garcia-Hoyos M, Bustamante-Aragones A, Cantalapiedra D, Diaz-Recasens J, Vallespin-Garcia E, Ayuso C, Lorda-Sanchez I

*Hum Reprod* (2006) 21(4):958-66

*"MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages"*

Diego-Alvarez D, Rodriguez de Alba M, Cardero-Merlo R, Diaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C, Lorda-Sanchez I

*Prenat Diagn* (2007) 27:765-71

# Application of quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages

Dan Diego-Alvarez<sup>1</sup>, Maria Garcia-Hoyos, Maria Jose Trujillo, Cristina Gonzalez-Gonzalez, Marta Rodriguez de Alba, Carmen Ayuso, Carmen Ramos-Corrales and Isabel Lorda-Sanchez

Fundacion Jimenez Diaz - Human Genetics, Avda. Reyes Catolicos, 2 Madrid 28040 Spain

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed. Dan Diego-Alvarez, E-mail: ddiego@fjd.es

**BACKGROUND:** Aneuploidies involve ~80% of chromosomal anomalies found in spontaneous miscarriages. Since cytogenetic studies show high rates of failure, we have incorporated the quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) technique to the study of numerical chromosome anomalies in miscarriages. **METHODS:** Multiplex and simple QF-PCR assays have been performed on 160 miscarriage and 34 parental DNA samples analysing specific short tandem repeat (STR) markers for chromosomes 2, 7, 13, 15, 16, 18, 21, 22 and X. Cases successfully karyotyped were used as controls in our study. **RESULTS:** While maternal contamination could be detected in such cases, a molecular result was obtained for 94% of miscarriages without a cytogenetic one. Thirty-six per cent of them were diagnosed with numerical chromosome anomalies. Parental origin of the extra chromosome and the error stage of meiosis could be also determined. **CONCLUSIONS:** QF-PCR represents a useful and reliable tool to diagnose aneuploidies in spontaneous miscarriages. It provides information about parental and meiotic origin of anomaly, allowing an appropriate genetic counselling.

*Key words:* abortion/aneuploidy/QF-PCR/spontaneous miscarriage/STR marker

## Introduction

Embryo loss represents ~10–15% of conceptions with clinical evidence of pregnancy (Miller *et al.*, 1980; Warburton *et al.*, 1980) and ~65% of all gestations (Santalo *et al.*, 1987). Presumptive causes of pregnancy loss include genetic, chromosomal, anatomic, endocrine and immunological factors, infections, thrombophilic disorders and other unidentified causes (Carp *et al.*, 2001).

More than 50% of spontaneous miscarriages carry chromosomal disorders, up to 96% of them being numerical chromosome abnormalities (Carrera *et al.*, 1996). Identification of the possible cause of fetal loss significantly reduces long-term psychological distress in women with a miscarriage (Nikcevic *et al.*, 1999) and enables improved genetic counselling for those couples in future pregnancies (Carp *et al.*, 2001).

Although cytogenetic study of miscarriages is highly recommended even in the case of the first spontaneous abortion (Sanchez *et al.*, 1999; Silvestre *et al.*, 2002), conventional cytogenetic studies (karyotyping or FISH) entail certain problems such as culture failure, infection of the sample or maternal contamination. Moreover, those techniques are usually expensive and need a moderate period of time in order to obtain results.

We have incorporated the molecular QF-PCR technique to the study of spontaneous miscarriages since it has been described as a rapid, sensitive, accurate, reproducible and reliable diagnostic method to detect aneuploidies (Ban *et al.*, 2002).

The aim of the present study is to propose the QF-PCR technique as a molecular tool complementary to cytogenetic studies of spontaneous miscarriages. It could be especially useful for those cases in which karyotyping fails, or for discounting a wrong diagnosis when overgrowth of maternal cells occurs, by analysing maternal DNA. To our knowledge, this is the first report of the application of QF-PCR to the study of spontaneous miscarriages.

## Material and methods

### *Biological samples*

One hundred and sixty miscarriage and 34 parental DNA samples corresponding to 17 couples have been studied. Miscarriage samples have been provided to the Department of Genetics of FJD since 1996 by the obstetrics service of the hospital and some private clinics to perform cytogenetic studies. Specimens of which tissue material was available were employed in this study for DNA extraction. Miscarriage samples consisted in fetal remains obtained after

surgical evacuation from clinical abortions between the 4th and 24th weeks of gestation (mean 15 weeks of gestation). One hundred and forty-eight out of 160 miscarriages were cultured following the protocol described by Moragón and Ramos-Corrales (1978) and GTG-banded for karyotyping; three were not cultured because ultrasonographic examinations showed skeletal dysplasia phenotype and nine were non-viable for karyotyping because of deterioration of the sample (6/9) (advanced autolysis in macerated abortions) or because they were preserved in formalin (3/9). Remains were stored frozen both at  $-20^{\circ}\text{C}$  and in liquid nitrogen until DNA extraction was performed. Most genomic DNA samples from abortions were obtained from fresh, frozen and formalin-fixed tissues following standard or commercial protocols. Tissue Kit reagents (QIAGEN, Germany) and the BioRobot EZ1 (QIAGEN) were used after dissection of 100–150 mg of sample and 48–72 h of digestion at  $56^{\circ}\text{C}$  with proteinase K. A small proportion of miscarriage DNA samples was isolated following a standard phenol–chloroform extraction procedure. Parental DNA samples were extracted from peripheral blood with the DNA blood 350  $\mu\text{l}$  extraction Kit (QIAGEN) and the BioRobot EZ1.

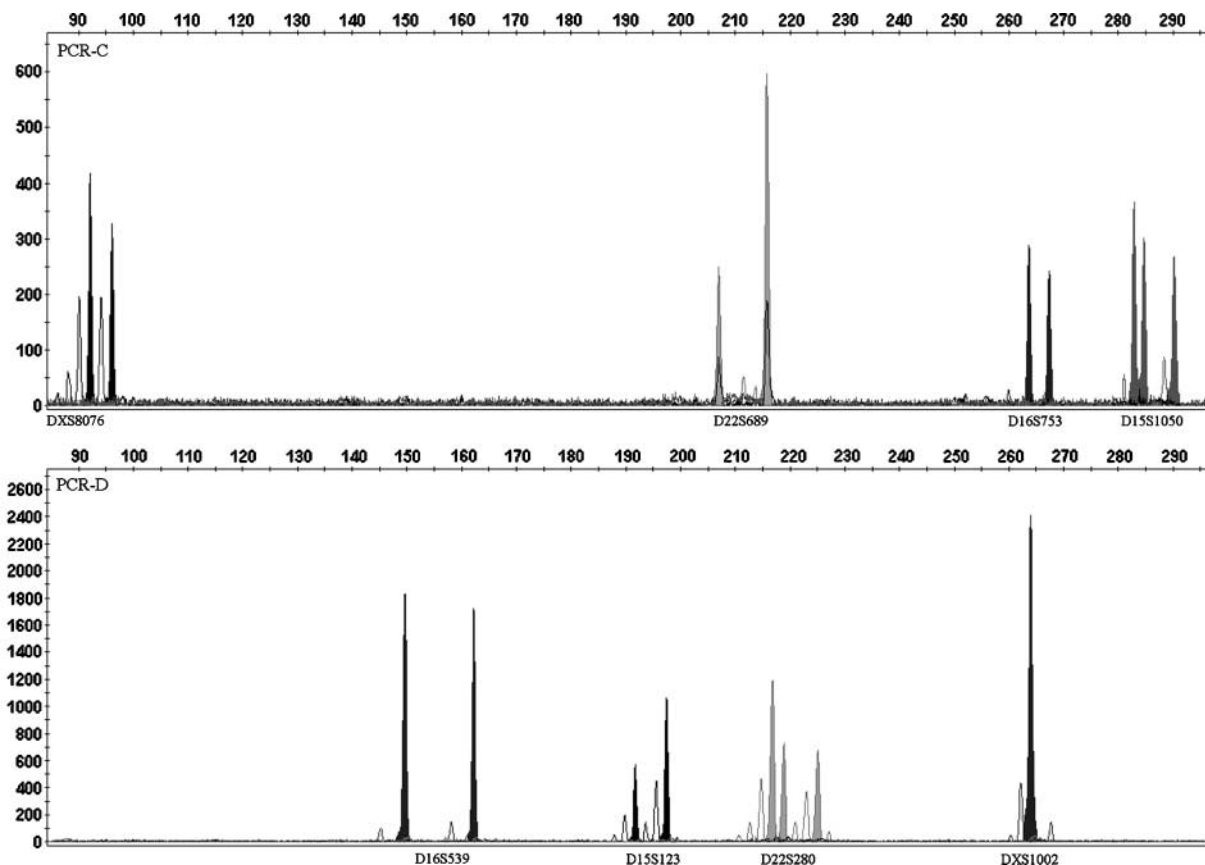
The present study has been accomplished according to the 1964 'Declaration of Helsinki' (World Medical Organization, 1996).

### QF-PCR

QF-PCR is based on the assumption that within the exponential phase of PCR amplification, the amount of specific DNA produced is proportional to the quantity of the initial target. In order to

achieve this the optimal number of PCR cycles must be limited to avoid reaching an amplification plateau. By amplifying highly polymorphic regions specific for a chromosome, such as short tandem repeats (STR), we should find a high rate of heterozygosity among different allelic forms and individuals. Tetra- or pentanucleotide repeats have been preferentially employed in view of their stability and suitability for amplification and analysis. By labelling primers with a fluorescent dye, we are able to detect dosage ratios of the PCR products from the analysis of the fluorescent peak areas shown by a Genetic Analyzer. Thus, in normal heterozygotes the ratio of fluorescent activity for the two peaks corresponding to the PCR products should be within the range 0.8–1.4 (disomic diallelic). Few normal subjects should be homozygotes showing one peak of activity (disomic monoallelic). Besides, in a trisomic patient the three doses of an STR marker can be detected either as three peaks of fluorescent activities with a 1:1:1 ratio (trisomic triallelic) or as a pattern of two peaks with a ratio or dosage  $<0.65$  or  $>1.8$  (trisomic diallelic) (Hulten *et al.*, 2003) (Figure 1). Triploidy of specimens is assumed when all of the markers studied, which map to different chromosomes, show a trisomic pattern of amplification. Uniparental disomy (UPD) for a targeted region or chromosome is assumed when the pattern of amplification of various STR markers corresponds to the inherited alleles from one progenitor with the absence of the other progenitor alleles.

A rapid screening of sex and numerical anomalies for chromosomes 13, 15, 16, 18, 21, 22 and X was carried out with the 160 miscarriage DNA samples performing four multiplex PCR assays



**Figure 1.** Multiplex QF-PCR assays (PCR-C and PCR-D) with STR markers in a DNA sample of a spontaneous abortion affected of double trisomy (+15, +22). The x-axis shows length of PCR products in base pairs as determined by use of internal lane standard and the y-axis shows the fluorescence intensity in arbitrary units. Trisomy 15 is evidenced by trisomic triallelic pattern (1:1:1) for D15S1050 and trisomic diallelic (2:1) for D15S123; trisomy 22 is shown as trisomic diallelic pattern (2:1) for D22S689 and trisomic triallelic pattern (1:1:1) for D22S280.

**Table I.** Primers used in Multiplex PCR assays. Note: F: forward; R: reverse. *Italics: based on our experience over Caucasian population.* The Genome Database homepage: [www.gdb.org](http://www.gdb.org)

Marker		5'-Fluorescent Label	Primer sequences	Allele Range (bp)	Heterozygosity	Nucleotide Repeat	Chromosome Location	References
PCR-A								
AMXY	F	6-FAM	5'-CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG-3'	106 (X)/ 112 (Y)	—	—	Xp22.1-22.3/ Yp11.2	Mannucci <i>et al.</i> , 1994
D13S631	R F	NED	5'-ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG-3' 5'-GGCAACAAGAGCAAACTCT-3'	195–215	0.94	Tetra	13q32.2	Adinolfi <i>et al.</i> , 1997; Pertl <i>et al.</i> , 1997
D18S535	R F	HEX	5'-TAGCCCTCACCATGATTGG-3' 5'-TCATGTGACAAAAGCCACAC-3'	130–154	0.92	Tetra	18q12.3	Adinolfi <i>et al.</i> , 1997; Pertl <i>et al.</i> , 1997
D21S1414	R F	6-FAM	5'-AGACAGAAATATAGATGAGAATGCA-3' 5'-AAATTAGTGTCTGGCACCCAGTA-3'	344–364	0.88	Tetra	21q21.1	Adinolfi <i>et al.</i> , 1997; Pertl <i>et al.</i> , 1997
	R		5'-CAATTCCCAAGTGAATTGCCTTC-3'					
PCR-B								
X22	F	6-FAM	5'-TAATGAGAGTTGGAAGAAA-3'	198–238	0.87	Penta	Xq28 / Yqter	Cirigliano <i>et al.</i> , 1999; Adinolfi and Cirigliano, 2000
XHPRT	R F	6-FAM	5'-CCCATTGTTGCTACTTGAGA-3' 5'-ATGCCACAGATAATACACATCCCC-3'	280–296	0.85	Tetra	Xq26.1	Adinolfi <i>et al.</i> , 1997; Pertl <i>et al.</i> , 1997; Cirigliano <i>et al.</i> , 1999
D13S634	R F	NED	5'-CTCTCCAGAATAGTTAGATGTAGGTAT-3' 5'-TCCAGATAGGCAGATTCAAT-3'	466–498	0.81	Tetra	13q14.13	Adinolfi <i>et al.</i> , 1997; Pertl <i>et al.</i> , 1997
D18S386	R F	HEX	5'-CCTTCTTCTTCCCATGATA-3' 5'-TCAGGAGAAATCACTTGGAAAC-3'	337–389	0.88	Tetra	18q22.1-22.2	Pertl <i>et al.</i> , 1999
D21S1411	R F	NED	5'-TCCATGAAGTAGCTAAGCAG-3' 5'-ATGATGAATGCATAGATGGATG-3'	269–321	0.93	Tetra	21q22.3	Adinolfi <i>et al.</i> , 1997; Pertl <i>et al.</i> , 1997
	R		5'-AATGTGTGTCCTTCCAGGC-3'					
PCR-C								
DXS8076	F	NED	5'-AACTTAGGATACCCCATATGTG-3'	93–101	0.68	Di	Xq21.1	Genome Database
	R		5'-AGTGCTACCTCCACAAACAG-3'					
D15S1050	F	PET	5'-TGGAACATCTGTCATAGTGG-3'	285–297	0.77	Di	15q22.31	Genome Database
	R		5'-TCCCTGTTTAATCATCTTCA-3'					
D16S753	F	6-FAM	5'-CAGGCTGAATGACAGAACAA-3'	261–281	0.75	Tetra	16p11.2	Genome Database
	R		5'-ATTGAAAACAACTCCGTCCA-3'					
D22S689	F	HEX	5'-TATGTACAGACCTGCAACTTGC-3'	205–237	0.73	Tetra	22q12.1	Genome Database
	R		5'-CCTGCCTGCCTATCTATCTG-3'					
PCR-D								
DXS1002	F	6-FAM	5'-CTGCTACCCTTTAGTTCTCTC-3'	266–274	0.70	Di	Xq21.2	Genome Database
	R		5'-TCCATGTTGCTGCGAA-3'					
D15S123	F	NED	5'-AGCTGAACCCAATGGACT-3'	188–206	0.73	Di	15q21.1	Genome Database
	R		5'-TTTCATGCCACCAACAAA-3'					
D16S539	F	6-FAM	5'-GATCCCAAGCTCTTCTCTT-3'	145–169	0.79	Tetra	16q24.1	Genome Database
	R		5'-ACGTTTGTGTGTGCATCTGT-3'					
D22S280	F	VIC	5'-GCTCCAGCCTATCAGGATG-3'	216–228	0.79	Di	22q12.3	Genome Database
	R		5'-GATTCCAGATCACAAAAGTGGT-3'					

**Table II.** Additional STR markers used in simple PCR assays. Note: H: Heterozygosity; F: forward; R: reverse; n.a.: not available. *Based on our experience over Caucasian population*

Marker		Primer sequences	Allele Range (bp)	H	Nucleotide Repeat	Chromosome Location
D13S317	F	5'-ACAGAAGTCTGGGATGTGGA-3'	176–204	0.78	Tetra	13q31.1
	R	5'-GCCCCAAAAGACAGACAGAA-3'				
D13S796	F	5'-CATGGATGCAGAATTCACAG-3'	144–168	0.77	Tetra	13q33.3
	R	5'-TCATCTCCCTGTTTGGTAGC-3'				
D13S797	F	5'-GGTTTGCTGGCATCTGTATT-3'	175–207	0.63	Tetra	13q33.2
	R	5'-TGTCTGGAGGCTTTTCAGTC-3'				
D15S11	F	5'-GACATAGACCACAAAGAAACCTTAGACCAG-3'	246–266	n.a.	Di	15q11.2
	R	5'-GTGGTTACTGAGGCAAGAAATTGGTGACTG-3'				
D15S125	F	5'-TTCCACACATGACCGC-3'	157–169	0.79	Di	15q22.32
	R	5'-CCCCGGAAGACCGTGA-3'				
D18S1002	F	5'-CAAAGAGTGAATGCTGTACAAACAGC-3'	286–318	0.81	Tetra	18q11.1
	R	5'-CAAGATGTGAGTGTGCTTTTCAGGAG-3'				
D21S11	F	5'-GTGAGTCAATTCCCCAAG-3'	218–238	0.90	Tetra	21q21.1
	R	5'-GTTGTATTAGTCAATGTTCTCC-3'				
D21S1412	F	5'-CGGAGGTTGCAGTGAGTTG-3'	389–429	0.80	Tetra	21q22.2
	R	5'-GGGAAGGCTATGGAGGAGA-3'				
D22S264	F	5'-ATTAATCATAAAGGAGCCC-3'	190–210	0.80	Di	22q11.21
	R	5'-CACCCACACAGAGGTATTCC-3'				
D22S1638	F	5'-TCACGCCACTACCCTCCAG-3'	107–109	n.a.	Di	22q11
	R	5'-GACAACAGCAAATTGCACATT-3'				

(Table I). PCR assays A and B were performed in a total volume of 25 µl containing 40–100 µg of genomic DNA, 150 µmol/l dNTP (Invitrogen Corporation, USA), 1.26–37.5 pmol of each primer, 1 × AmpliTaq Gold polymerase buffer (15 mmol/l MgCl<sub>2</sub>) (Applied Biosystems, USA), and 1 U of AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems). After denaturation at 95 °C for 5 min, hot-start PCR was carried out in a GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) for 25 cycles at 95 °C for 60 s, 55 °C for 60 s, and 72 °C for 90 s. Final extension was for 10 min at 72 °C. PCR assays C and D were carried out in a total volume of 15 µl containing 40–100 µg of genomic DNA, 125 µmol/l dNTP, 5–10 pmol of each primer, 1 × Taq polymerase buffer (15 mmol/l MgCl<sub>2</sub>), and 1 U of AmpliTaq Gold polymerase. After denaturation at 95 °C for 12 min, hot-start PCR was carried out for 10 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 90 s, and 15 cycles at 89 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 90 s, with a final extension time of 30 min at 72 °C. Fluorescence-labelled PCR products were electrophoresed in an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer and analysed with the GeneMapper 3.5 software package (Applied Biosystems). For uninformative results (both markers of the same chromosome showed a monoallelic pattern of amplification) or to confirm a trisomic pattern, additional markers (Table II) were separately PCR-amplified in a total volume of 15 µl containing genomic DNA, 125 µmol/l dNTP, 10 pmol of each primer, 1 × Taq polymerase buffer

(15 mmol/l MgCl<sub>2</sub>), and 0.6 U of AmpliTaq Gold polymerase. PCR cycles were the same as those for C and D PCR assays. Annealing temperature for D21S1412 was 58 °C.

Various simple PCR assays were also carried out in some samples to confirm both a cytogenetic or CGH result or when a target chromosome existed. This was the case for specimens tested for chromosomes 2, 7 and 17.

Whenever possible, the same STR markers were studied in parental DNA in order to determine both parental and meiotic origin of aneuploidy and the fetal origin of the DNA sample.

Cases successfully karyotyped were used as blind controls in our study.

## Results

Ninety-four out of 148 miscarriage samples (63.5%) were successfully karyotyped: 27 of them as normal males, 32 as normal females and 35 (37%) as having numerical chromosomal aberrations. Fifty-four miscarriages (36.5%) failed culture due to misgrowth or to infection of the sample. One hundred and fifty-one out of 160 (94%) miscarriage DNA samples were successfully PCR amplified for all of the chromosome markers tested in this study.

Discrepancies between molecular and cytogenetic results occurred in eight out of 89 cases. Five of those karyotyped as normal females resulted in chromosomally male abortuses by QF-PCR, two of them trisomic for chromosome 13. Three cases karyotyped as affected of aneuploidy were diagnosed as normal females by QF-PCR.

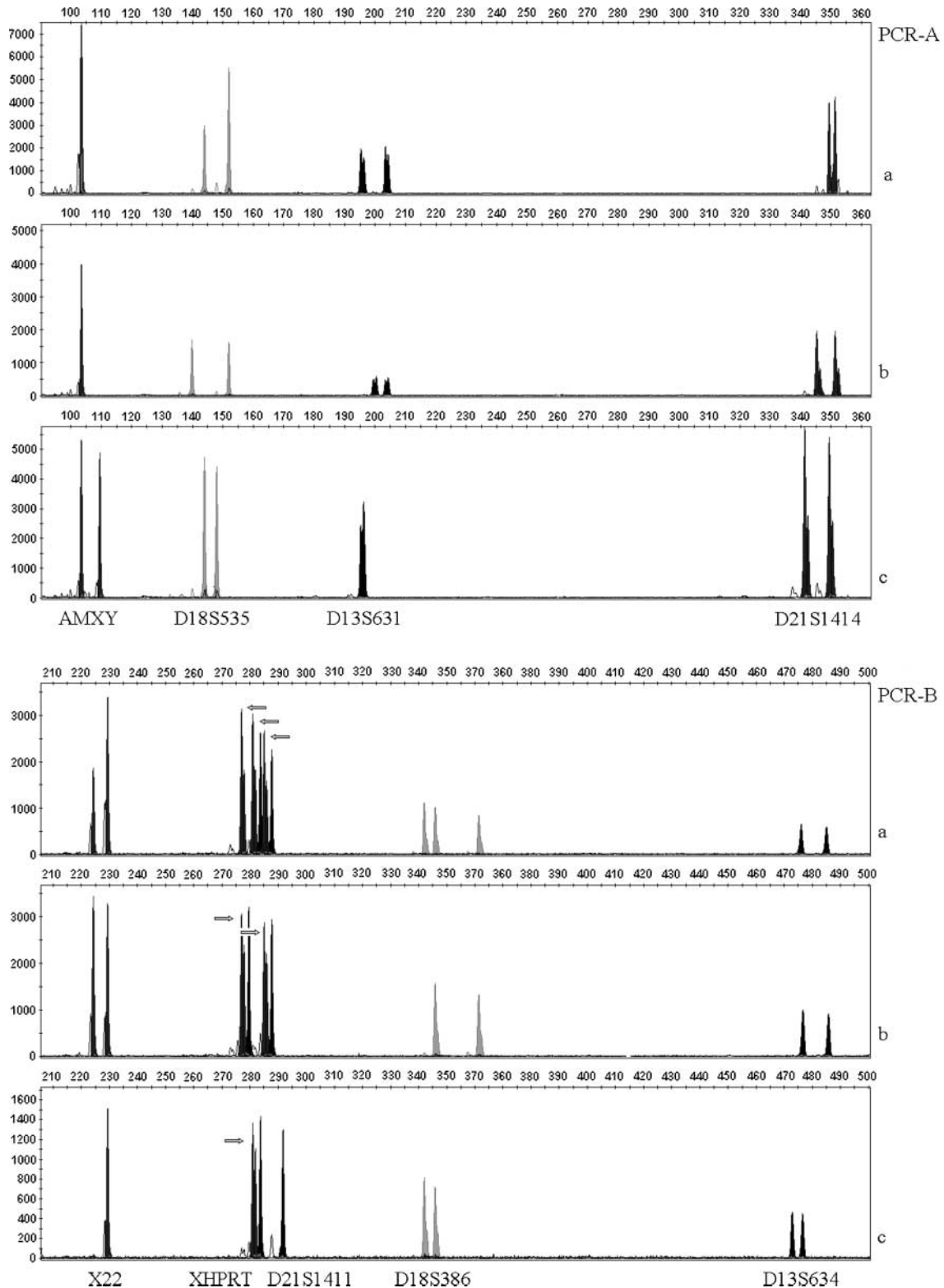
A molecular result for 62 of the 66 (94%) abortions without cytogenetic result was obtained by QF-PCR. Thirty-six per cent (24/66) of cases were diagnosed as having numerical chromosome anomalies (Table III) and two cases of maternal contamination were detected.

Parental and meiotic origin of the extra/absent chromosomal material was identified in 14 miscarriages. A complete trisomy 2 was found in a miscarriage whose father was a balanced carrier of a 2;17 translocation. Paternal origin of

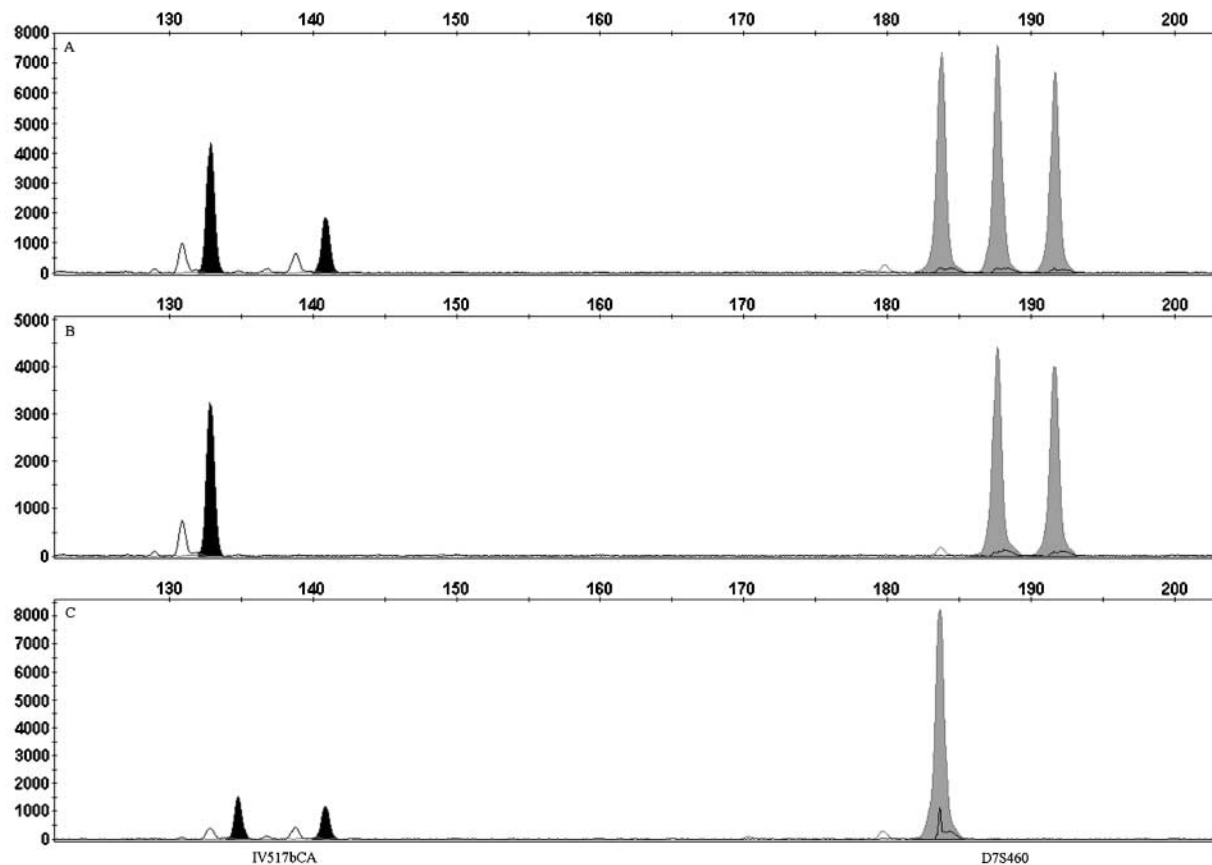
**Table III.** Number of abortions without karyotype diagnosed of having a numerical chromosome anomaly by QF-PCR

Numerical anomaly	Number of cases
Trisomy 2	1
Trisomy 7	1
Trisomy 13	6
Trisomy 15	1
Trisomy 18	2
Trisomy 21	3
Trisomy 22	3
Double trisomy	1
Monosomy X	3
Triploidy	3
Total	24





**Figure 2.** Multiplex QF-PCR assays (PCR-A and PCR-B) with STR markers in a miscarriage affected of double trisomy (+18, +X) and its parents. The x-axis shows length of PCR products in base pairs as determined by use of internal lane standard and the y-axis shows the fluorescence intensity in arbitrary units. Electrophoretograms show miscarriage (a), maternal (b) and paternal (c) PCR products. Trisomy 18 is evidenced by trisomic diallelic pattern (2:1) for D18S535 (18q12.3) and trisomic triallelic pattern (1:1:1) for D18S386 (18q22.1-22.2); trisomy X is shown as trisomic diallelic pattern (2:1) for X22 (Xq28/Yqter) and trisomic triallelic pattern (1:1:1) for XHPRT (Xq26.1) (arrows). Maternal origin of the extra chromosome material and the meiotic stage of nondisjunction (MII) can be inferred by analyzing inherited alleles and chromosome location of STR markers.



**Figure 3.** Electrophoretograms of two STRs located on chromosome 7 in a miscarriage and its parents. The x-axis shows length of PCR products in base pairs as determined by use of internal lane standard and the y-axis shows the fluorescence intensity in arbitrary units. Abortion (A), maternal (B) and paternal (C) DNA samples. Trisomy 7 in miscarriage is showed as trisomic diallelic pattern (2:1) for IVS17bCA (7q32.1) and trisomic triallelic pattern (1:1:1) for D7S460 (7p14.2). Assuming no crossing-over have occurred between DNA markers and centromere, maternal origin due to an error in the first meiotic division is assumed for the extra chromosome material.

the extra chromosome material could be established. In a 45,XO case it was determined that the sexual chromosome fault was of paternal origin. Two double trisomies involving chromosomes 15, 22 (Figure 1) and 8, 21 respectively were determined to be maternal in origin due to non-disjunction at meiosis I (MI) while a third double trisomy involving 18 and X chromosomes also had a maternal origin because of an error in meiosis II (MII) (Figure 2). Moreover, one case of trisomy 7 (Figure 3), two cases of trisomy 21 and 22 and four cases of trisomy 13 were determined to be maternal in origin due to non-disjunction in MI.

Although the QF-PCR technique is capable of detecting mosaicism, no such cases have been detected in our study.

## Discussion

Identification of the cause of fetal loss reduces the feelings of self-blame, anxiety, depression and grief in women with a miscarriage (Nikcevic *et al.*, 1999). Moreover, knowing the exact origin of fetal loss allows us to give an improved genetic counselling in further pregnancies and to predict the frequency of recurrence in each patient. Although some studies suggest that there are non-cytogenetic factors associated with recurrent miscarriages (RM), particularly in women aged

< 36 years (Stephenson *et al.*, 2002), other researchers maintain that couples with RM (two or more previous abortions) produce chromosomally abnormal embryos in a significantly higher percentage than those not having this reproductive problem (Rubio *et al.*, 2003). In the same study it was reported that in 22% of couples undergoing an IVF programme the incidence of chromosomal aberrations affected all of the embryos they produced. It is well known that >50% of spontaneous miscarriages carry chromosomal disorders. Among chromosomal causes of fetal loss, aneuploidies are responsible for >86% of them. Even though QF-PCR is currently being used for the rapid screening of aneuploidies for prenatal diagnosis in amniotic fluid and chorionic villus samples (Pertl *et al.*, 1999; Carrera, 2001; Bili *et al.*, 2002; Andonova *et al.*, 2004), this is the first report of application of this technique to the study of spontaneous miscarriages.

Evaluation of pregnancy losses is usually done several days after fetal demise. The main risk when studying aborted specimens by classic cytogenetics is the deterioration of the sample. Success of culture is often reduced by the high rates of microbial or maternal contamination, obtaining no or incorrect results. This is the case for 36.5% of our abortions. QF-PCR has permitted us to obtain a molecular result for 94% of

samples studied and to detect 24 cases of aneuploidy in miscarriages that had no cytogenetic diagnosis. While conventional cytogenetics needs living cells to culture, DNA analysis can provide results with a high efficiency, independently of the antiquity of the sample. High amounts of DNA are obtained from fresh and frozen tissue and can also be isolated from small pieces or sections of formalin-fixed or paraffin-embedded tissues (Bell *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2002) and be stored for several years. In the present study, 54 miscarriage tissue samples (36.5%) failed to culture due to misgrowth or to infection, and only nine out of 160 (5.6%) DNA samples were not suitable for PCR amplification. This could be due to the small amount of DNA (samples extracted from formalin-fixed tissues) or to an error in the extraction procedure.

It is well known that the incidence of fetuses with chromosomal anomalies is reduced as pregnancy progresses. The mechanism of natural selection may operate through developmental arrest and degeneration of abnormal embryos. Autosomal monosomies are rarely found in spontaneous abortions because of its high lethality. Although trisomies for all the chromosomes have been reported in spontaneous miscarriages (Hassold *et al.*, 1980; Hanna *et al.*, 1997), suggesting that they are capable of achieving implantation and initiating a pregnancy (Dunn *et al.*, 2001), the most frequently cited in literature are those involving chromosomes 15, 16, 14 and 22 (Carrera *et al.*, 1996; Stephenson *et al.*, 2002) and are supposed to be the major cause of early abortions affected by chromosomal anomalies. Despite single trisomies comprising the vast majority of aneuploidies (~86% single trisomies versus ~14% monosomies), double and triple trisomies appear with a frequency of 0.21–2.8% and 0.05% respectively of karyotyped spontaneous abortions (Reddy, 1997, 1999). In spite of this lower frequency, several chromosomes have undergone molecular study in all of our samples in order to detect these kinds of anomalies. Multiplex analysis by QF-PCR permits us to test various chromosomes while a large number of samples can be handled simultaneously. PCR assays for chromosomes 13, 18, 21, X and Y have been carried out in the first screening because of their high incidence of aneuploidy among late abortions (Hassold *et al.*, 1980). Work in progress consists in designing multiplex PCR to study aneuploidies of other chromosomes.

Parental and meiotic origin of aneuploidy can be inferred by QF-PCR (Figure 3), analysing pericentromeric STR markers whenever parents are informative for them. Heteromorphic regions at or near centromeres are not crossed over, and are the optimal markers for tracing the origin of aneuploidy, avoiding misdiagnosis due to recombination events (Robinson *et al.*, 1993). Based on the literature (Bond and Chandley, 1983), non-disjunction at the first meiotic division in oogenesis seems to be the most common origin of the extra chromosome in trisomies. This is consistent with our results, in which, as expected, nine out of nine cases of simple trisomies and two out of three double trisomies were maternal in origin due to non-disjunction in MI. The paternal origin of a complete trisomy 2 due to 3:1 segregation was established in a miscarriage whose father was a balanced carrier of a 2;17 translocation (Lorda-Sanchez *et al.*, 2005).

A general problem when studying early pregnancy losses is overgrowth of maternal cells in culture (Hassold *et al.*, 1980). This usually leads to a wrong 46,XX normal karyotype. While neither karyotyping nor FISH can detect it (except some cases of male fetuses or when a numerical anomaly appears, as stated by Jobanputra *et al.*, 2002), QF-PCR analysis of microsatellites can discard it and determine the maternal or fetal origin of the sample. In fact, those cases in which discrepancies occurred among cytogenetic and molecular results were due to maternal origin or contamination of the sample. Different origin of tissue material collected for culture and to store for molecular studies seems to be the cause of misdiagnosis in three cases amplified by QF-PCR obtained as normal females. Concordance with the rest of the results shows the reliability of the QF-PCR technique.

Despite aneuploidies involving the majority of chromosomal causes of abortions, total chromosome uniparental disomy (UPD) comprises ~3% of genetically unexplained pregnancy wastage (Fritz *et al.*, 2001). Some studies have reported maternal heterodisomy (inheritance of both maternal homologues) as the most common cause of UPD, meiotic non-disjunction being followed by trisomy rescue (Kotzot, 2004) or monosomy complementation (somatic reduplication) considered to be the major mechanisms of formation. Molecular analysis of STR markers by QF-PCR in parental and abortion DNA samples would permit the diagnosis of iso- and heterodisomy of both maternal and paternal origin.

**Table IV.** Comparison between different techniques employed to the study of spontaneous abortions. 1: depending on the size of the rearrangement; 2: targeted regions using specific probes/primers; 3: referred to fungible costs only

	Karyotype	FISH	CGH	QF-PCR
Aneuploidy	Suitable	Suitable	Suitable	Suitable
Poliploidy	Suitable	Suitable	Not suitable	Triploidy
Balanced Chr. Rearrangements	Suitable	Suitable	Not suitable	Not suitable
Unbalanced Chr. Rearrangements	High resolution <sup>1</sup>	Suitable <sup>2</sup>	Suitable <sup>1</sup>	Suitable <sup>2</sup>
Mosaicism	Suitable	Suitable	Not suitable	Suitable
Uniparental Disomy (UPD)	Not suitable	Not suitable	Not suitable	Suitable
Maternal contamination	Male fetuses	Male fetuses	Not suitable	Suitable
Paternal origin	Not suitable	Not suitable	Not suitable	Suitable
Meiotic origin	Not suitable	Not suitable	Not suitable	Suitable
Time required	2–3 weeks	2–3 days	1 week	2–3 days
Economic costs <sup>3</sup>	Medium	High	High	Low

Although >83% of chromosomal anomalies can be diagnosed by QF-PCR, this technique poses some limitations for the detection of chromosomal rearrangements and small deletions or duplications. Triploidy and tetraploidy comprise ~13 and ~4% respectively of chromosomal anomalies found in spontaneous miscarriages (Alberman and Creasy, 1977). While triploidy can be diagnosed by QF-PCR, tetraploidy due to abnormal cleavage after a normal zygote has formed would not be easily detected. Based on our experiments and on published data (Lorda-Sanchez *et al.*, 2003), autosomal and gonosomal mosaicism can be detected up to the presence of 1%, but in practice it is difficult to determine, and parental DNA is required to detect it.

Apart from its limitations (Hulten *et al.*, 2003), QF-PCR also presents exclusive advantages over other techniques currently employed for the study of abortions, different from karyotyping such as FISH and comparative genomic hybridization (CGH) (Table IV). Jobanputra *et al.* (2002) have proposed multiplex interphase FISH on uncultured cells as a reliable screening for common aneuploidies in spontaneous miscarriages. They stated that maternal contamination can be detected in those cases of male abortions or when a numerical chromosome anomaly is revealed. Nevertheless, if the result by FISH were a normal female the fetal or maternal origin of the sample could not be determined. QF-PCR analysis of microsatellites can detect maternal contamination and determine the fetal or maternal origin of the sample by comparing the alleles from the fetal sample with those from maternal DNA. Another limitation of FISH consists of cross-hybridization of probes to different chromosomes, leading to wrong diagnoses. Since STR markers are specific for a selected region of a specific chromosome, QF-PCR avoids this problem. CGH provides a useful method to detect aneuploidies and can also detect partial gains or losses (>3 Mb), analysing the entire genome of the sample in a single experiment, but it does not detect changes in ploidy. CGH technique is also more laborious, time-consuming and expensive than QF-PCR.

Based on our experience, QF-PCR can be considered as a complementary and reliable tool to cytogenetic studies of spontaneous miscarriages: (i) It provides results in cases in which cytogenetic diagnosis fails. (ii) It allows the diagnosis of >83% of chromosomal anomalies commonly found in pregnancy losses. (iii) Despite the deterioration of the sample, the percentage of success using QF-PCR is higher than karyotyping. (iv) It permits determination of the fetal origin of the sample and allows us to discount maternal contamination. (v) Parental and meiotic origin of aneuploidy can both be determined. (vi) It is a rapid technique, which can take ~48 h from the reception of the sample to the time a diagnosis is established. (vii) A large number of samples can be processed simultaneously. (viii) It is a relatively low cost technique.

## Acknowledgements

The authors thank collaborating volunteer couples. Dan Diego-Alvarez is supported by Fundación Conchita Rábago de

Jiménez Díaz. This project is supported by a grant from FIS (PI 02/0068).

## References

- Adinolfi M and Cirigliano V (2000) Detection of fetal cells in transcervical samples using X22 marker. *J Med Genet* 37,E1.
- Adinolfi M, Pertl B and Sherlock J (1997) Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat Diagn* 17,1299–1311.
- Alberman ED and Creasy MR (1977) Frequency of chromosomal abnormalities in miscarriages and perinatal deaths. *J Med Genet* 14,313–315.
- Andonova S, Vazharova R, Dimitrova V, Mazneikova V, Toncheva D and Kremensky I (2004) Introduction of the QF-PCR analysis for the purposes of prenatal diagnosis in Bulgaria: estimation of applicability of 6 STR markers on chromosomes 21 and 18. *Prenat Diagn* 24,202–208.
- Ban Z, Nagy B, Papp C, Toth-Pal E and Papp Z (2002) Rapid diagnosis of triploidy of maternal origin using fluorescent PCR and DNA fragment analysis in the third trimester of pregnancy. *Prenat Diagn* 22,984–987.
- Bell KA, Van Deerlin PG, Feinberg RF, du Manoir S and Haddad BR (2001) Diagnosis of aneuploidy in archival, paraffin-embedded pregnancy-loss tissues by comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* 75,374–379.
- Bili C, Divane A, Apeessos A, Konstantinos T, Apostolos A, Ioannis B, Periklis T and Florentin L (2002) Prenatal diagnosis of common aneuploidies using quantitative fluorescent PCR. *Prenat Diagn* 22,360–365.
- Bond DJ and Chandley AC (1983) The origin and causes of aneuploidy in man. In *Aneuploidy*. Oxford Monographs on Medical Genetics. Oxford Medical Publications, pp. 55–76.
- Carp H, Toder V, Aviram A, Daniely M, Mashiach S and Barkai G (2001) Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 75,678–682.
- Carrera M (2001) Screening prenatal de aneuploidías: QF-PCR y FISH. *Prog Diag Prenat* 13,262–266.
- Carrera M, Ribas I, Torrents M, Méndez B, Serra B, de la Iglesia C, Boada M, Veiga A and Barri PN (1996) Abortos espontáneos de repetición y anomalías cromosómicas numéricas: ¿es el diagnóstico preimplantacional una alternativa diagnóstica? *Prog Diagn Prenat* 8,342–347.
- Cirigliano V, Sherlock J, Conway G, Quilter C, Rodeck C and Adinolfi M (1999) Rapid detection of chromosomes X and Y aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. *Prenat Diagn* 19,1099–1103.
- Dunn TM, Grunfeld L and Kardon NB (2001) Trisomy 1 in a clinically recognized IVF pregnancy. *Am J Med Genet* 99,152–153.
- Fritz B, Aslan M, Kalscheuer V, Ramsing M, Saar K, Fuchs B and Rehder H (2001) Low incidence of UPD in spontaneous abortions beyond the 5th gestational week. *Eur J Hum Genet* 9,910–916.
- Hanna JS, Shires P and Matile G (1997) Trisomy 1 in a clinically recognized pregnancy. *Am J Med Genet* 68,98.
- Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, Matsuyama A, Wilson C, Yamane JA and Jacobs PA (1980) A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* 44(Pt 2),151–178.
- Hulten MA, Dhanjal S and Pertl B (2003) Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reproduction* 126,279–297.
- Jobanputra V, Sobrino A, Kinney A, Kline J and Warburton D (2002) Multiplex interphase FISH as a screen for common aneuploidies in spontaneous abortions. *Hum Reprod* 17,1166–1170.
- Kotzot D (2004) Advanced parental age in maternal uniparental disomy (UPD): implications for the mechanism of formation. *Eur J Hum Genet* 12,343–346.
- Lorda-Sanchez I, Trujillo MJ, Gomez-Garre P, de Alba MR, Gonzalez-Gonzalez C, Garcia-Hoyos M, Ayuso C and Ramos C (2003) Turner phenotype in a girl with a 45,X/46,XX/47,XX, +18 mosaicism. *Am J Med Genet* 15, 121A,20–24.
- Lorda-Sanchez I, Diego-Alvarez D, Ayuso C, Rodriguez de Alba M, Trujillo MJ and Ramos C (2005) Trisomy 2 due to a 3:1 segregation in an abortion studied by QF-PCR and CGH. *Mol Hum Rep*, Submitted.
- Mannucci A, Sullivan KM, Ivanov PL and Gill P (1994) Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. *Int J Legal Med* 106,190–193.
- Miller JF, Williamson E, Glue J, Gordon YB, Grudzinskas JG and Sykes A (1980) Fetal loss after implantation. A prospective study. *Lancet* 13(8194),554–556.
- Moragón FJ and Ramos-Corrales C (1978) El huevo abortivo III. Estudio citogenético y consideración de su etiología. *Acta Gin* 32,91–111.

- Nikcevic AV, Tunkel SA, Kuczmierczyk AR and Nicolaides KH (1999) Investigation of the cause of miscarriage and its influence on women's psychological distress. *Br J Obstet Gynaecol* 106,808–813.
- Pertl B, Kopp S, Kroisel PM, Hausler M, Sherlock J, Winter R and Adinolfi M (1997) Quantitative fluorescence polymerase chain reaction for the rapid prenatal detection of common aneuploidies and fetal sex. *Am J Obstet Gynecol* 177,899–906.
- Pertl B, Kopp S, Kroisel PM, Tului L, Brambati B and Adinolfi M (1999) Rapid detection of chromosome aneuploidies by quantitative fluorescence PCR: first application on 247 chorionic villus samples. *J Med Genet* 36,300–303.
- Reddy KS (1997) Double trisomy in spontaneous abortions. *Hum Genet* 101,339–345.
- Reddy KS (1999) Triple aneuploidy in spontaneous abortions. *Clin Genet* 56,103–104.
- Robinson WP, Bernasconi F, Mutirangura A, Ledbetter DH, Langlois S, Malcolm S, Morris MA and Schinzel AA (1993) Nondisjunction of chromosome 15: origin and recombination. *Am J Hum Genet* 53,740–751.
- Rubio C, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohi J and Pellicer A (2003) Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* 18,182–188.
- Sanchez JM, Franzi L, Collia F, De Diaz SL, Panal M and Dubner M (1999) Cytogenetic study of spontaneous abortions by transabdominal villus sampling and direct analysis of villi. *Prenat Diagn* 19,601–603.
- Santalo J, Catala V and Badenas J (1987) Chromosomal abnormalities and IVF. In Egozcue J (ed.) *Cellular Aspects of In Vitro Fertilization*. Cell Biology Reviews. Springer, Leiola, pp. 63–72.
- Shi SR, Datar R, Liu C, Wu L, Zhang Z, Cote RJ and Taylor CR (2002) DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution. *Histochem Cell Biol* 122,211–218.
- Silvestre E, Cusi V, Antich J and Caballín MR (2002) Protocolo para el estudio citogenético de los abortos espontáneos. *Prog Diagn Prenat* 14,146–151.
- Stephenson MD, Awartani KA and Robinson WP (2002) Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod* 17,446–451.
- Warburton D, Stein Z, Kline J, Susser M, et al. (1980) Chromosome abnormalities in spontaneous abortion: data from the New York City study. In Porter IH and Hook EB (eds) *Human Embryonic and Fetal Death*. Academic Press, New York, pp. 261–287.
- World Medical Organization (1996) Declaration of Helsinki 1964. *Br Med J* 313,1448–1449.

*Submitted on November 22, 2004; resubmitted on January 7, 2005; accepted on January 12, 2005*

## SHORT COMMUNICATION

# Trisomy 2 due to a 3 : 1 segregation in an abortion studied by QF-PCR and CGH

Isabel Lorda-Sánchez\*, Dan Diego-Alvarez, Carmen Ayuso, Marta Rodríguez de Alba, Maria Jose Trujillo and Carmen Ramos

*Department of Genetics, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain*

Balanced reciprocal translocation is one of the known causes of recurrent spontaneous abortions. Cytogenetic studies of unbalanced miscarriages are difficult due to the growth failure of early loss and usually macerated abortions. We present a molecular study of an abortion in which the father carries a balanced reciprocal translocation t(2;17)(q32.1;q24.3) using QF-PCR and CGH techniques. DNA analysis showed the presence of a trisomy 2 due to a 3 : 1 interchange segregation. Recombinant events could also be investigated by comparing DNA samples from the family. We propose QF-PCR in addition to CGH as an efficient diagnostic method to improve our knowledge of unbalanced offspring in balanced translocation carriers. Copyright © 2005 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS: trisomy 2; abortion; 3 : 1 segregation; QF-PCR; CGH

## INTRODUCTION

Balanced reciprocal translocation is the most common structural chromosomal aberration in humans, with an incidence of 1 in 625 (Van Dyke *et al.*, 1983). This incidence is higher among couples with recurrent abortions due to the likelihood of imbalanced offspring.

Studies of meiotic segregation in males carrying a balanced reciprocal translocation have shown that the percentages of unbalanced sperm vary from 20 to 77% according to several factors, such as the nature of the chromosomes involved or the length of the translocated segments (TSs). Adjacent I segregation or the undistinguishable alternate segregation with an interstitial chiasma are the most frequent origins of unbalanced gametes, followed by adjacent II and 3 : 1 segregations (Armstrong and Hulten, 1998; Oliver-Bonet *et al.*, 2002).

The use of preimplantation genetic diagnosis due to parental translocation also showed rates above 70% of unbalanced segregation in preimplantation embryos (Lim *et al.*, 2004). This rate is higher than the 10% of unbalances observed among term children. Therefore, it is postulated that a post zygotic selection eliminates the majority of the unbalanced embryos, most of them previous to the recognition of the pregnancy. Cytogenetic studies of unbalanced miscarriages are difficult due to the growth failure of early loss and usually macerated abortions.

We present a molecular study of an abortion in which the father carries a balanced reciprocal translocation t(2;17)(q32.1;q24.3). The study was performed using

analysis of STR markers and CGH techniques. As far as we know, it is the first report of a miscarriage with trisomy 2 due to a 3 : 1 interchange segregation of a balanced translocation.

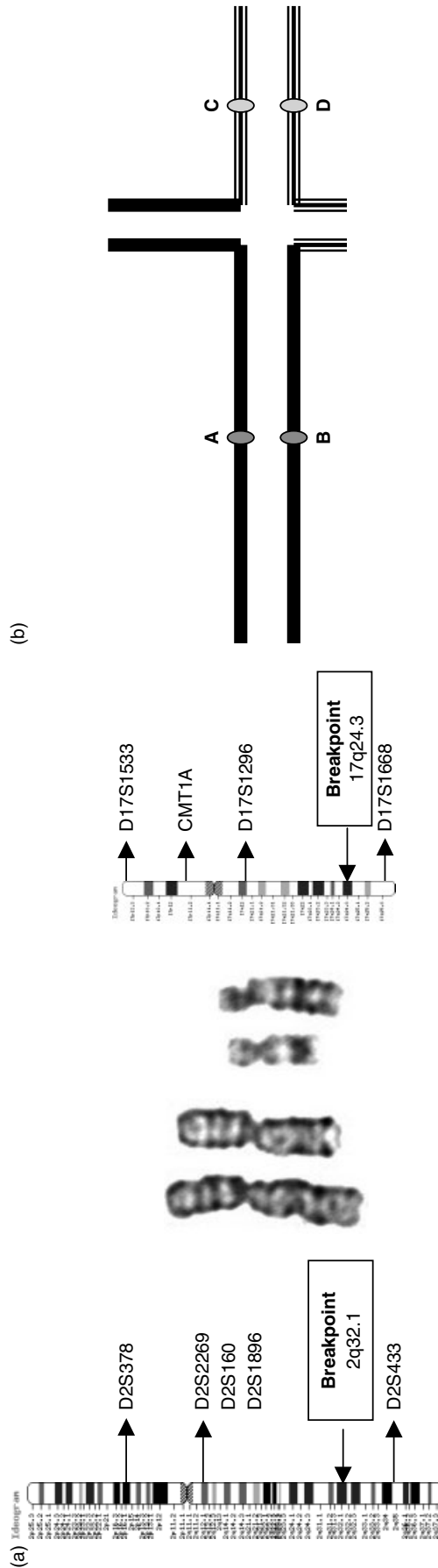
## CASE REPORT

This case was the second pregnancy of an unrelated Caucasian couple. The first pregnancy ended in a female newborn, who presented Pierre-Robin sequence with cleft palate and micrognathia. Cytogenetic analysis of a blood sample of this child showed an apparently balanced translocation between chromosomes 2 and 17 : 46,XX, t(2;17)(q32.1;q24.3). The same translocation was found in the father, who also presented Pierre-Robin sequence. No translocation was found in the karyotypes of the paternal grandparents. Therefore, the translocation was *de novo* in the father. The relation between the translocation breakpoints and the malformation is being investigated.

The second pregnancy ended in spontaneous abortion at 9 weeks and 6 days of gestation. Owing to the early age of gestation, the material obtained from curettage did not allow further investigations about malformations in the fetus. However, it was examined to ensure fetal origin, and cleaned and separated for culture and DNA isolation. The material for DNA was frozen at  $-70^{\circ}$ . Tissue culture failed to grow and no cytogenetic results could be obtained. DNA was then extracted following standard protocols.

In order to establish if the miscarriage was associated with an unbalanced segregation product, we used the QF-PCR technique. PCR assays using five STR markers of chromosome 2 and eight STR markers of chromosome 17 were carried out using fluorescently labelled

\*Correspondence to: Dr Isabel Lorda-Sánchez, Genética-Fundación Jiménez Díaz, Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain. E-mail: ilorda@fjd.es



(c)

Marker	Locus	Adjacent-I			Adjacent-II		3:1 *				Present
		A C	B D		A B	C D	A B C	A B D	A C D	B C D	
		2, der(17)	17, der(2)		2, der(2)	17, der(17)	2 der(2) der(17)	2 der(2) 17	2 der(17) 17	der(2) 17 der(17)	Case
D2S378	2p16.1	Disomy	Disomy		Trisomy	Monosomy	Trisomy	Trisomy	Disomy	Disomy	Trisomy
D2S2269	2q13	Disomy	Disomy		Trisomy	Monosomy	Trisomy	Trisomy	Disomy	Disomy	Trisomy
D2S160	2q13	Disomy	Disomy		Trisomy	Monosomy	Trisomy	Trisomy	Disomy	Disomy	Trisomy
D2S1896	2q13	Disomy	Disomy		Trisomy	Monosomy	Trisomy	Trisomy	Disomy	Disomy	Trisomy
D2S433	2q35	Trisomy	Monosomy		Disomy	Disomy	Trisomy	Disomy	Trisomy	Disomy	Trisomy
D17S1533	17p13.3	Disomy	Disomy		Monosomy	Trisomy	Disomy	Disomy	Trisomy	Disomy	Disomy
CMT1A/HN PP	17p11.2	Disomy	Disomy		Monosomy	Trisomy	Disomy	Disomy	Trisomy	Disomy	Disomy
D17S1293	17q12	Disomy	Disomy		Monosomy	Trisomy	Disomy	Disomy	Trisomy	Disomy	Disomy
D17S668	17q25.3	Monosomy	Trisomy		Disomy	Disomy	Disomy	Disomy	Disomy	Disomy	Disomy

Figure 1—(a) Partial karyotype of the translocation carried by the father and daughter and the ideograms of both chromosomes implicated with localisation of the breakpoints and the different markers used, (b) quadrivalent formed by the paternal translocated chromosomes and their homologues during meiosis I and (c) expected results for the different markers in the unbalanced offspring depending on the segregation of the quadrivalent, assuming no interstitial chiasmata. \*The unbalances leading to complete monosomy in the zygote due to this segregation have been excluded

primers. Amplification products were run in the ABI Prism 3100 Genetic Analyzer and then analysed with the Gene Mapper 3.5 software (Applied Biosystems). Expected unbalanced results for the different markers depending on the segregation of the quadrivalent formed by the paternal translocated chromosomes and their homologues during meiosis I are shown in Figure 1. The QF-PCR analysis of the STR markers using DNA from the aborted fetus showed a trisomic pattern for all of the chromosome 2 markers and a disomic pattern for the chromosome 17 ones, corresponding to a 3:1 interchange mode (der(2), der(17) and an extra chromosome 2).

DNA extracted from peripheral blood samples from parents, paternal grandparents and the daughter carrying the balanced translocation were also tested by QF-PCR. Alleles were compared to detect recombinations (Figure 2). For chromosome 2, the daughter and the aborted fetus received the same maternal alleles. The daughter received the chromosome 2 from the paternal grandmother without apparent recombination. The trisomic pattern in the aborted fetus did not allow more investigation regarding recombination.

For chromosome 17, two recombinations were detected between maternal homologues. Since DNA from maternal grandparents was not available, there was no possibility to establish if both recombinations occurred in the same meiosis or one in either chromosome 17 of the daughter and the aborted fetus respectively. Regarding paternal chromosome 17, one recombination event affecting the short arm was detected in the daughter. In addition, although both, the daughter and the aborted fetus, carried the translocated chromosome 17, the pericentromeric markers showed different paternally inherited alleles. This confirmed another recombination event within the interstitial region between the marker D17S1293 located on 17q12 and the breakpoint locus. The daughter and the aborted fetus inherited the same paternal alleles for the D2S433 and D17S668 markers located both on the translocated segment, but the 192 bp allele on D2S433 was inherited from the grandfather while the 160 bp allele on D17S668 was inherited from the grandmother.

The complete trisomy 2 detected by QF-PCR was confirmed by Comparative Genome Hybridisation (CGH).

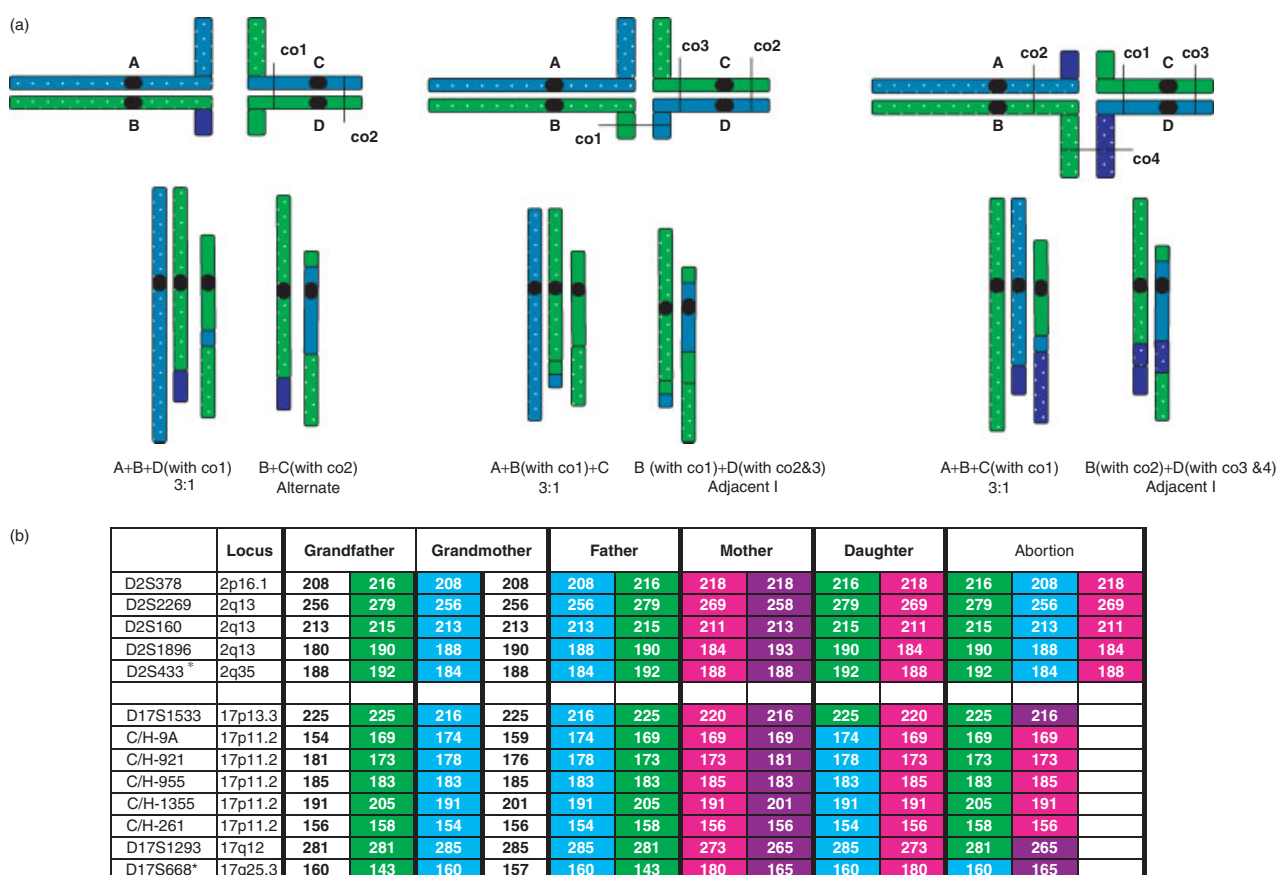


Figure 2—(a) Possible quadrivalents with the necessary crossing over (co) to adapt the products of the segregation (see the chromatids below) to the results of the QF-PCR shown in the following table. In the first quadrivalent, the 160 bp allele on D17S668 inherited from the grandmother and the 192 bp allele on D2S433 inherited from the grandfather are considered to be located within the translocated segment in the father. The translocation in the daughter resulted from an alternate segregation. In the second and third quadrivalents, the chromosomes implicated in the translocation are inherited from the same grandparent. The translocation in the daughter resulted from an adjacent I segregation after a recombination event within the interstitial region of chromosome 2 or 17. (b) Table comparing alleles (in base pairs) for these markers from the aborted fetus, parents, paternal grandparents and the daughter carrying the balanced translocation. \*STR markers located on the translocated segments (TSs)



DNA from the aborted fetus was processed for this technique using standard protocols. Metaphase spreads were analysed using Quips CGH software (Vysis). Results are shown in Figure 3.

## DISCUSSION

Balanced translocations have been associated with infertility as well as recurrent abortions. The percentage of unbalanced sperm in reciprocal translocation carriers is

within the range of 20 to 77% (Guttenbach *et al.*, 1997), similar to the 70% of unbalanced embryos found in studies of preimplantation genetic diagnosis for translocations (Lim *et al.*, 2004), but higher than the 10% of unbalances observed among term children (Boue and Galliano, 1984). This difference suggests a negative selection against unbalanced embryos and fetuses during pregnancy, but little is known about timing of selection and types of segregation implicated in these spontaneous abortions. We report a molecular study of an unbalanced fetus using QF-PCR and CGH techniques after culture failure.

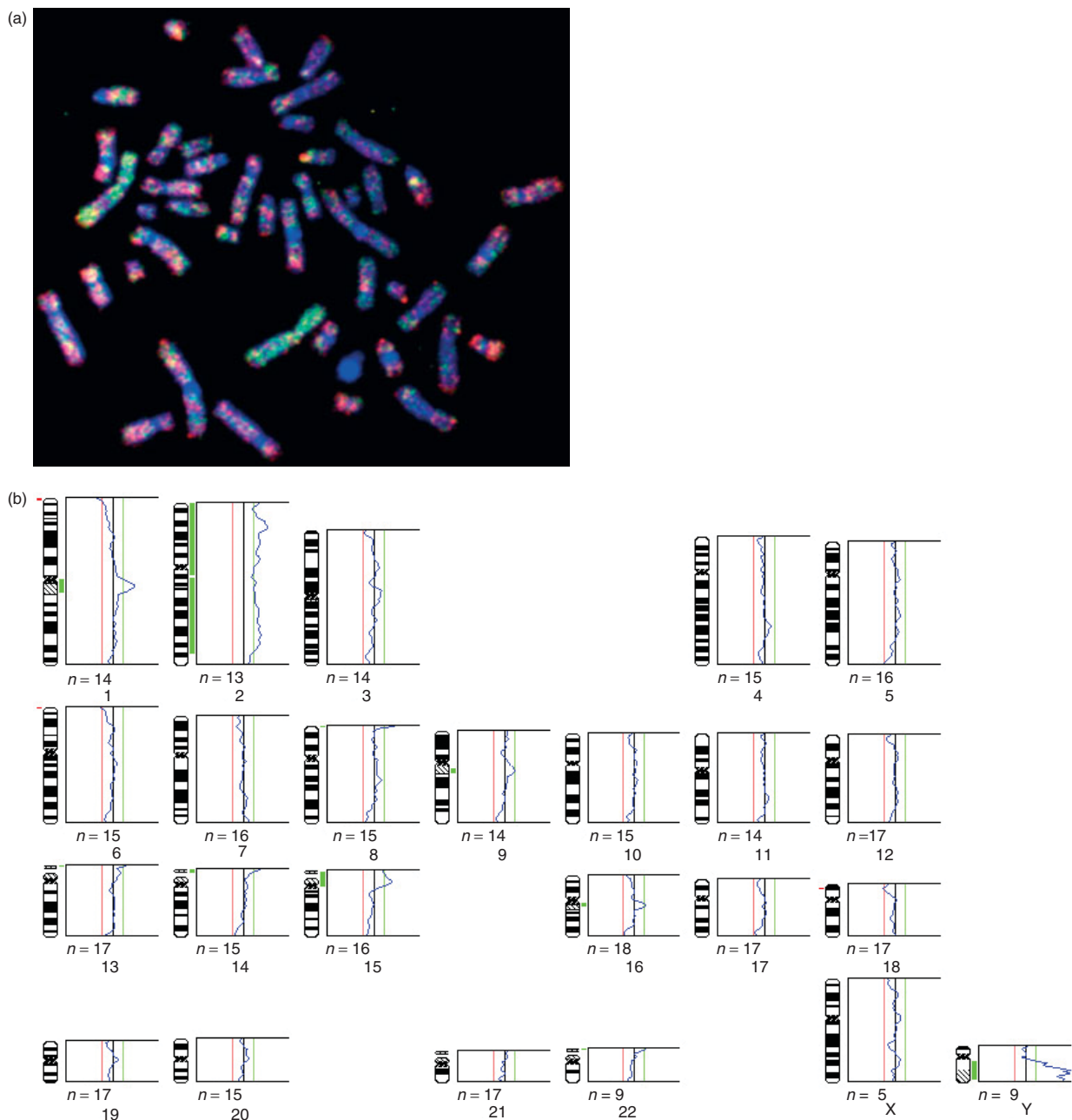


Figure 3—Comparative genomic hybridisation (CGH) with DNA of the aborted fetus. (a) Metaphase showing a higher green intensity on chromosome 2 suggesting a gain of material. (b) Complete fluorescence profile ratio of the aborted fetus. The average profile for chromosome 2 is higher than 1.2, indicating a gain of material. Normal average profile (around 1.0) is shown for chromosome 17. Gains are shown in green, losses in red

DNA analysis by CGH is an alternative method to study abortions that failed to grow in culture (Bell *et al.*, 2001). We propose QF-PCR as a complementary technique, which allows not only to determine numerical anomalies but also to confirm the fetal origin of the sample as well as the parental origin of extra chromosomal material by comparing with parental DNA (Diego-Alvarez *et al.*, 2005). In unbalanced translocated fetuses, it also allows to establish the segregation patterns. In the present case, the QF-PCR results showed a 3 : 1 interchange segregation pattern (Figure 1). The 3 : 1 segregation is not very common in unbalanced sperm (Oliver-Bonet *et al.*, 2002) but it is more frequent in unbalanced term children of reciprocal translocation carriers (Jalbert *et al.*, 1980).

Although the likelihood of unbalances in reciprocal translocation carriers differs greatly from one translocation to the other, Jalbert *et al.* (1980) proposed that the translocations predisposing to the 3 : 1 interchange segregation have the following in common: (1) The centric segments (CSs) and the TSs are of unequal length, with the long TSs attached to the short CSs and therefore the two derivative chromosomes are large; (2) at least one chromosome is either an acrocentric or a number 9; (3) the two derivative chromosomes segregate with the smallest normal chromosome. The present case fulfils only the first common characteristic. In fact, chromosome 2 is larger than chromosome 17, but cytogenetic analyses in recurrent abortions have shown a higher frequency of trisomy 2 versus trisomy 17 (Stephenson *et al.*, 2002). In addition, a higher incidence of paternal meiotic errors involved in trisomy 2 abortions suggested that diploidy for chromosome 2 may influence sperm selection (Robinson *et al.*, 1999).

The comparison of DNA samples from the family by QF-PCR allowed us to investigate the recombinant events. The analysis of the haplotypes using STR markers located within the TSs showed that the 192 bp allele on D2S433 was inherited from the paternal grandfather while the 160 bp allele on D17S668 was inherited from the grandmother. This implies either (1) that a recombinant event occurred between breakpoints and these loci in both the daughter and the aborted fetus (see crossing over in Figure 2a), or (2) that the translocation occurred in the zygote or in an early post zygotic stage in the father.

The presence of different alleles for the marker D17S1293 in the daughter and the aborted fetus implies at least one recombination event in the interstitial region (17cen-→q23). Variable increase of chiasmata in the interstitial region has been found in some male meiotic studies for specific translocations (Armstrong and Hulten, 1998; Oliver-Bonet *et al.*, 2004), and this seems to affect the segregation mechanism. Assuming that both the 160 bp allele on D17S668 and the 192 bp allele on D2S433 are located within the TSs in the father, the recombination event in the interstitial region would have occurred in chromosome 17 of the aborted fetus followed by a 3 : 1 segregation. Besides, the alternate segregation of the daughter would have occurred after a recombination on the short arm of chromosome 17 (see first quadrivalent of Figure 2a)

Alternatively, if we assume that a chiasma occurred in one of the TSs, then both implicated chromosomes would derive from the same grandparent. This would imply more recombination events, including one within the interstitial region of chromosome 2 or 17 of the daughter. Then the translocation in the daughter would result from an adjacent I segregation (see second and third quadrivalents of Figure 2a). The influence of the number and position of the recombination events in the different segregation patterns might be ascertained by studying further cases using DNA analysis with different STR markers.

In summary, we propose QF-PCR in addition to CGH as an efficient diagnostic method to improve our knowledge of unbalanced offspring in balanced translocation carriers.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a grant from F.I.S (02/0068) and INERGEN (FISC03/05). Dan Diego Alvarez is sponsored by Fundacion Conchita Rabago de Jimenez Diaz. We thank Diego Cantalapiedra for the English language assistance.

#### REFERENCES

- Armstrong SJ, Hulten MA. 1998. Meiotic segregation analysis by FISH investigations in sperm and spermatocytes of translocation heterozygotes. *Eur J Hum Genet* **6**: 430–431.
- Bell KA, Van Deerlin PG, Feinberg RF, du Manoir S, Haddad BR. 2001. Diagnosis of aneuploidy in archival, paraffin-embedded pregnancy-loss tissues by comparative genomic hybridisation. *Fertil Steril* **75**: 374–379.
- Boue A, Galliano P. 1984. Collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1356 prenatal diagnoses. *Prenat Diagn* **4**: 45–67.
- Diego-Alvarez D, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, *et al.* 2005. Application of QF-PCR with STR markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages. *Hum Reprod* **20**: 1235–1243.
- Guttenbach M, Engel W, Schmid M. 1997. Analysis of structural chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosomes aberrations. A review. *Hum Genet* **100**: 1–21.
- Jalbert P, Sele B, Jalbert H. 1980. Reciprocal translocations: a way to predict the model of imbalanced segregation by pachytene diagram drawing. *Hum Genet* **55**: 209–222.
- Lim CK, Jun JH, Min DM, *et al.* 2004. Efficacy and clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis using FISH for couples of reciprocal and Robertsonian translocations: the Korean experience. *Prenat Diagn* **24**: 556–561.
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Carrera M, Egozcue J, Benet J. 2002. Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. *Mol Hum Reprod* **8**: 958–963.
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M, *et al.* 2004. From spermatocytes to sperm: meiotic behaviour of human male reciprocal translocation. *Hum Reprod* **19**: 2515–2522.
- Robinson WP, Bernasconi F, Lau A, McFadden DE. 1999. Frequency of meiotic trisomy depends on involved chromosome and mode of ascertainment. *Am J Med Genet* **84**: 34–42.
- Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. 2002. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriages: a case-control study. *Hum Reprod* **17**: 446–451.
- Van Dyke DL, Weiss L, Roberson JR, Babu VR. 1983. The frequency and mutation rate of balanced autosomal rearrangements in man estimated from prenatal genetic studies for advanced maternal age. *Am J Hum Genet* **35**: 301–308.

# Double trisomy in spontaneous miscarriages: cytogenetic and molecular approach

Dan Diego-Alvarez<sup>1,3</sup>, Carmen Ramos-Corrales<sup>1</sup>, Maria Garcia-Hoyos<sup>1</sup>,  
Ana Bustamante-Aragones<sup>1</sup>, Diego Cantalapiedra<sup>1</sup>, Joaquin Diaz-Recasens<sup>2</sup>,  
Elena Vallespin-Garcia<sup>1</sup>, Carmen Ayuso<sup>1</sup> and Isabel Lorda-Sanchez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Human Genetics and <sup>2</sup>Obstetrics and Gynecology, Fundacion Jimenez Diaz, Avda Reyes Católicos 2, 28040, Madrid, Spain.

<sup>3</sup>To whom correspondence should be addressed: ddiego@fjd.es

**BACKGROUND:** Although single trisomy is the most common chromosomal abnormality observed within first trimester spontaneous abortions (SA) (>50%), double trisomy (DT) ranges from 0.21 to 2.8% in the literature. Since little is known about mechanisms underlying DT, we report the results of our experience with 517 SA, establishing parental origin and cell stage of non-disjunction when possible in DT cases, and making a revision of those previously reported. **METHODS:** Cytogenetic analysis was performed in all aborted specimens. Quantitative fluorescent PCR (QF-PCR) and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) were performed in DT cases in order to assess parental origin and stage of error of aneuploidy in addition to its reliability in detecting aneuploidies. **RESULTS:** Karyotyping was successful in 321 miscarriages; the rate of DT was 2.18%. Among the seven DT cases reported, three new combinations were found. Maternal origin was established for all DT SA analysed. Meiotic stage of error was presumed meiosis I (MI) for 48,XX+15+22 and 48,XX+8+21, meiosis II (MII) for 48,XXX+18, and MII and MI respectively for 48,XY+18+22. Molecular results agreed with cytogenetic results. **CONCLUSIONS:** Similar maternal age-related mechanisms could be implicated in both single and double trisomy. Molecular techniques could be useful in diagnosing not only single but multiple aneuploidy and determining its origin. This will improve our knowledge about mechanisms underlying human aneuploidy, and enable appropriate genetic counselling.

**Key words:** aneuploidy/double trisomy/MLPA/QF-PCR/spontaneous miscarriage

## Introduction

Although single trisomy is the most common chromosomal abnormality observed within first trimester spontaneous miscarriages (>50%) (Hassold *et al.*, 1980; Nagaishi *et al.*, 2004), double trisomy ranges from 0.21 to 2.8% among karyotyped spontaneous abortions (SA) in the literature (Carr, 1967; Creasy *et al.*, 1976; Lauritsen, 1976; Takahara *et al.*, 1977; Kajii *et al.*, 1980; Hassold *et al.*, 1980; Lin *et al.*, 1985; Eiben *et al.*, 1990; Zhou, 1990; Ohno *et al.*, 1991; Warburton *et al.*, 1991; Dejmek *et al.*, 1992; Gardo and Bajnoczky, 1992; Kalousek *et al.*, 1993; Reddy, 1997; Li *et al.*, 2005). Around 65% of all conceptions and 10% of all clinically recognized pregnancies end in fetal loss (Miller *et al.*, 1980; Warburton *et al.*, 1980; Santalo *et al.*, 1987). This suggests that frequency of double trisomy might be higher than the observed one. Mean gestational age has been described to be significantly lower for double trisomy cases than that reported for single trisomy ones (Reddy, 1997). However, some cases of double trisomies involving chromosomes 8, 13, 18, 21, X and Y have been observed in liveborns, suggesting that lethality of the abnormality depends on which chromosomes are involved in the aneuploidy.

Several chromosome-specific patterns for missegregation have been studied, such as those for autosomal trisomies involving chromosomes 8, 13–16, 18, 21 and 22 (Robinson *et al.*, 1993; Zaragoza *et al.*, 1994; Nicolaidis and Petersen, 1998). Despite the fact that maternal meiosis I non-disjunction seems to be the major cause of the whole single trisomy cases, chromosome-specific patterns do exist and a possible mitotic origin must also be considered.

Since little is known about biological mechanisms underlying double trisomy, we report the results of our experience with a collection of 517 spontaneous abortions (SA), establishing the parental origin and cell stage of non-disjunction when possible in double trisomy cases. Three new combinations are reported and new approaches to the screening of single and multiple aneuploidy are proposed. Even though karyotyping is still the preferred technique for the study of miscarriages, molecular techniques are beginning to appear as reliable methods in the diagnosis of numerical chromosome anomalies, which comprise the vast majority of chromosomal causes of fetal loss. As far as we know, only 178 complete double trisomy cases including this survey have been reported so far among miscarriages and liveborns. Moreover, only one study

concerning the origin of the additional chromosomes in double trisomy SA has been published to date (Li *et al.*, 2005).

## Materials and methods

### Patients and biological samples

A total of 517 miscarriage cases have been collected so far. Products of conception were provided to the Genetics Service of Fundación Jiménez Díaz (Madrid, Spain) since 1996 by the Obstetrics and Gynecology Service of the hospital and some private clinics to perform cytogenetic studies. Since May 2005, the entire curettage products after surgical interventions performed in our hospital have been processed in both genetic and anatomopathological studies (a total of 43 different serial samples). Miscarriage samples consisted of chorionic villi, embryo and/or placental tissue obtained after surgical evacuation between weeks 4 and 24 of gestation. To avoid maternal blood contamination, repeated washing of the sample in a saline solution (NaCl 0.9%) was performed prior to culturing. Selected material was examined to exclude maternal decidua remains and then cultivated in 3 ml of BIO-AMF-1 basal medium plus supplement (Biological Industries, Israel) containing HEPES 1 mol/l, penicillin–streptomycin and  $\alpha$ -glutamine 200 mmol/l (Gibco Invitrogen, CA, USA) following standard protocols. Metaphase spread slides were G-banded using trypsin–Giemsa for karyotyping. From 2003 onwards, a piece from the majority of the specimens was stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for DNA extraction in order to perform molecular studies as described in detail elsewhere (Diego-Alvarez *et al.*, 2005). Briefly, after dissection of 100–150 mg of tissue and chemical digestion with proteinase K at  $56^{\circ}\text{C}$  during 48–72 h, DNA was isolated with the Tissue Kit reagents and the BioRobot EZ1 (QUIAGEN, Hilden, Germany) following supplied protocols. Although DNA could be obtained from the majority of specimens to perform molecular studies, only abortions in which karyotype was available were included in this study.

Conceptional history of the seven couples implicated in the pregnancy losses was obtained so that genetic counselling could then be offered in most cases. All studied subjects were from Caucasian unrelated couples and five out of the seven couples had had at least one previous miscarriage (details are given in Table I). No information about the previous fetal losses except for the time and gestational age at which they occurred was available. After signed informed consent, blood samples were collected from both parents in order to determine the parental and cell stage origin of trisomies. DNA samples from four couples were extracted from 5 ml of peripheral blood in tubes with EDTA and the DNA blood 350  $\mu\text{l}$  extraction Kit for BioRobot EZ1 (QUIAGEN).

The present study has been performed according to the 1964 'Declaration of Helsinki' (World Medical Organization, 1996).

### Double trisomy studies

Conventional GTG-banded karyotype was performed in all the miscarriage samples in order to detect a possible chromosomal anomaly. A minimum of 10 metaphases were routinely analysed per specimen. When abnormal metaphases were found, a few more metaphases were counted before concluding a cytogenetic result.

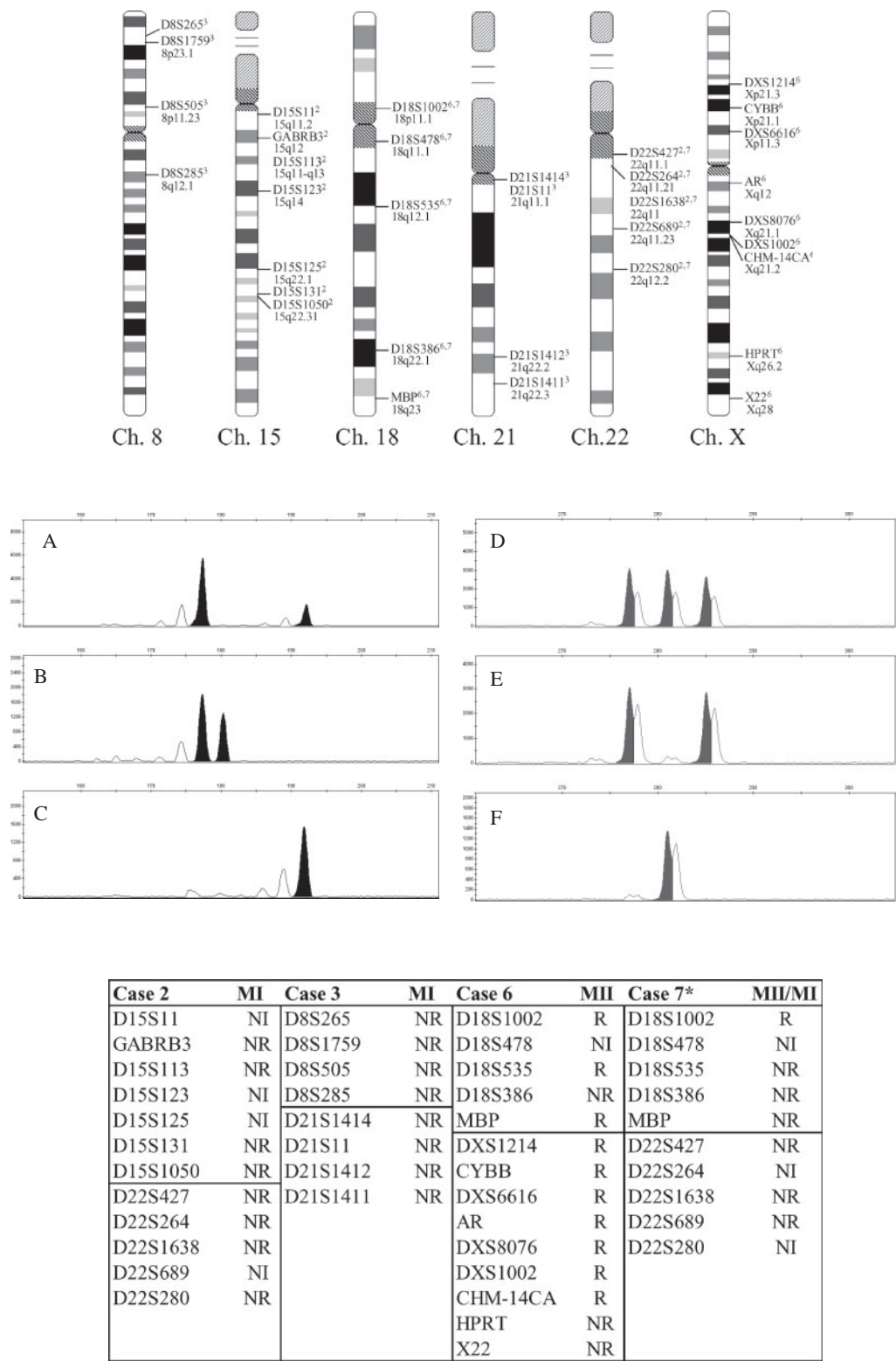
In order to confirm cytogenetic results and verify the reliability of molecular techniques to detect numerical chromosome anomalies, quantitative fluorescent (QF) PCR and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) with subtelomeric probes were performed as blinded assays in those cases in which DNA was available.

Trisomy can be detected by amplifying highly polymorphic regions of the DNA specific for a chromosome such as short tandem repeats (STR) by QF-PCR (Adinolfi *et al.*, 1997). Fluorescence-labelled amplification products are shown as different peaks or alleles varying in intensity (peak area) and size (in base pairs) after capillary electrophoresis in a Genetic Analyzer. As the amount of DNA produced is proportional to the quantity of the initial target, trisomy can be presented either in a triallelic form with relative peak area doses near to 1:1:1 or as a diallelic form (2:1) (Figure 1). An average of five highly polymorphic STR markers specific for each chromosome involved in the aneuploidy were analysed by QF-PCR in both parental and miscarriage DNA samples when possible. Parental origin and cell stage of error of the aneuploidy can be inferred by comparing the inherited alleles and their relative doses. Pericentromeric markers were preferentially employed. Although pericentromeric markers are in some cases by themselves inefficient for determining meiotic stage of error, the efficiency can be considerably increased if parental origin is known with certainty (Chakravarti, 1989). Parental origin was established when at least two different markers studied for each chromosome were informative (Robinson *et al.*, 1999). Meiotic origin of the aneuploidy was ensured when three distinct alleles were amplified in the abortion DNA sample. The meiotic division error could be inferred as meiosis I (MI) or meiosis II (MII) on the basis of non-reduction/reduction to homozygosity at the pericentromeric STR markers (Figure 1) (Chakravarti and Slangenaupt, 1987). On the other hand, a mitotic (post-zygotic) non-disjunction origin of trisomy is presumed when a trisomic diallelic pattern exists for chromosome-specific STR markers and the lack of observed recombination along the entire chromosome. Nonetheless, definitive proof of a somatic origin is impossible to establish because recombination events can cause large regions of a chromosome to be reduced to homozygosity even in

**Table I.** Chromosome constitution and origin of aneuploidy in double trisomy abortions

Case no.	Karyotype	Gestational age (weeks)	Pregnancy history	Parental origin	Stage of error of aneuploidy	Maternal age (years)	Paternal age (years)
1	48,XX,+9+21	10	G6/P2/A4	ND	ND	45	36
2	48,XX,+15+22	7	G3/P2/A1	Maternal	MI	37	39
3	48,XX,+8+21	8	G4/P2/A2	Maternal	MI	40	49
4	48,XY,+2+8	9	G3/P1/A2	ND	ND	36	35
5	48,XX,+20+22	11	G1/P0/A1	ND	ND	40	42
6	48,XXX,+18	13	G3/P1/A2	Maternal	MII	37	43
7	48,XY,+18+22	8	G4/P2/A2	Maternal	MI (22)/MII (18)	43	60
Mean $\pm$ SD		9.4 $\pm$ 2.1				39.7 $\pm$ 3.4	43.4 $\pm$ 8.7

G = gravida; P = para; A = abortion; ND = not determined; MI = meiosis I; MII = meiosis II.



**Figure 1.** Determination of parental origin and cell stage of error of aneuploidy based on non-reduction/reduction to homozygosity of microsatellite markers by QF-PCR. Ideograms show chromosomal location of STR markers analysed in double trisomy miscarriages (primer information available at [www.gdb.org](http://www.gdb.org)). Superscript type indicates the case number in which a specific microsatellite marker has been employed. Electropherograms illustrate reduction (*left*) and non-reduction (*right*) to homozygosity of two different STR markers (AR and HPRT respectively) in case 6. A, D: abortion; B, E: mother; C, F: father; NI: not informative; R: reduction; NR: non-reduction. Trisomy is evidenced by trisomic diallelic pattern (2:1) for AR and trisomic triallelic pattern (1:1:1) for HPRT in abortion DNA sample. By comparing inherited alleles from both parents, maternal origin in the first meiotic division (MI) is considered for the additional chromosome X in the miscarriage. \*As reduction to homozygosity occurs for D18S1002 (the most pericentromeric marker) in case 7, second meiotic division error is presumed for trisomy 18, although posterior recombination events may have lead to non-reduction to homozygosity of informative markers studied.

a meiotic error (Robinson *et al.*, 1999). STR markers were separately PCR-amplified as previously described (Diego-Alvarez *et al.*, 2005). Briefly, PCR assays were carried out in a total volume of 15 µl containing 40–100 µg of genomic DNA, 125 µmol/l dNTP (Invitrogen Corporation, USA), 10 pmol of each primer, 1×Taq polymerase buffer (15 mmol/l MgCl<sub>2</sub>) and 0.6 IU of AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). After denaturation at 95°C for 12 min, hot-start PCR was performed in a GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) for 10 cycles at 94°C for 30 s, 55°C for 30 s and 72°C for 90 s, and 15 cycles at 89°C for 30 s, 55°C for 30 s and 72°C for 90 s, with a final extension time of 30 min at 72°C. One microlitre of fluorescence-labelled PCR product was mixed with 12 µl of deionized formamide and 0.5 µl of 400HD Size Standard (Applied Biosystems). Mixed samples were electrophoresed in an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer and analysed with the GeneMapper 3.5 software package (Applied Biosystems).

Recently, a new molecular technique based on the amplification of specific probes previously hybridized onto target DNA sequences was described by Schouten *et al.* (2002). MLPA permits the relative quantification of up to 48 different DNA sequences in a single reaction requiring only 20 ng of sample DNA. Each probe consists of two oligonucleotides that hybridize to adjacent sites of the target sequence in the DNA. Once hybridized probe oligonucleotides are ligated, amplification by PCR with a unique primer pair (all ligated probes contain identical end sequences) is performed. As the amount of specific probes that are amplified depends on the quantity of target sequences present in the DNA, it allows the relative quantification of such sequences, enabling the detection of copy number changes such as deletions, duplications or whole chromosome aneuploidies. We have currently applied the MLPA SALSA-P070 Probe-mix (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) in miscarriage samples, which contains specific probes for subtelomeres of both arms for every chromosome, in order to detect such numerical anomalies. Trisomy may be suspected if subtelomeric probes for both arms of a chromosome appear duplicated. Duplication or deletion of a targeted sequence will be respectively shown as an ~1.5-fold increase or 0.5 decrease in relative peak area of the amplified fragment compared with that of a control sample after normalization of data by dividing each probe's signal strength by the average signal strength of the sample, and then by dividing this normalized peak pattern by the average peak pattern of all the samples in the same experiment. Although it can be relatively easy to detect duplications or deletions of targeted regions by analysing electropherograms if few samples are simultaneously shown, data should be normalized before finalizing conclusions. MLPA reactions were performed as recommended by the manufacturer's protocol with minor modifications. Briefly, 100–150 ng of abortion genomic DNA were diluted in 5 µl of distilled water and denatured at 98°C for 5 min. After lowering the temperature to 25°C, 1.5 µl of SALSA Probe-Mix and 1.5 µl of Probe-Mix Buffer were added to the eluted DNA sample. After denaturation at 95°C for 1 min, hybridization of probes was achieved by incubation at 60°C for 16 h. Thirty-two microlitres of Ligase-Mix containing 25 µl of distilled water, 3 µl of Buffer A, 3 µl of Buffer B and 1 µl of Ligase-65 were added at 54°C. After mixing by repeated pipetting, ligation of hybridized probes was performed at 54°C for 15 min. After heating at 98°C for 5 min, samples were stored at 4°C until amplification reaction was performed. PCR was carried out in a total volume of 25 µl containing 5 µl of ligation reaction product, 2 µl of PCR buffer, 13 µl of distilled water and 5 µl of Polymerase Mix (1 µl of primers, 1 µl of enzyme dilution Buffer, 2.75 µl of distilled water and 0.25 µl of Polymerase). Polymerase Mix was added when the sample was at 60°C. PCR reaction was performed for 35 cycles at 95°C for 30 s, 60°C at 30 s and 72°C for 60 s, with a final

extension of 20 min at 72°C. All the reagents are provided in kit form by MRC-Holland. One microlitre of sample was mixed with 12 µl of deionized formamide and 0.5 µl of 500 LIZ Size Standard, electrophoresed in an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer and analysed with the GeneMapper 3.5 software package (Applied Biosystems).

## Results

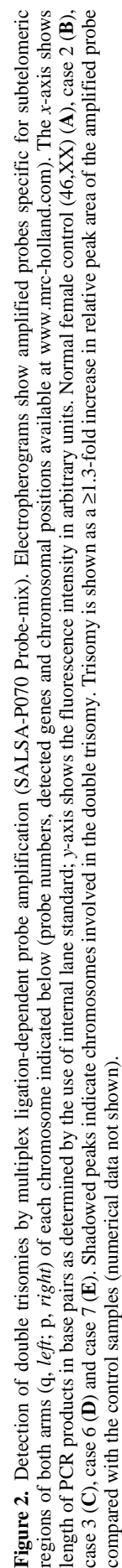
Karyotyping was attempted on 517 miscarriages, being successful in 321 of them. The rest (196) either failed to grow in culture or were infected. One hundred and twenty-nine out of 321 karyotypes (40.2%) were chromosomally abnormal. Complete single trisomy accounted for 61.24% of abnormal karyotypes, this frequency being similar to that from previous reports (Hassold and Jacobs, 1984; Robinson *et al.*, 2001; Nagaishi *et al.*, 2004). Seven out of 321 (2.18%) SA studied carried a double trisomy. Table I lists karyotype of the double trisomy abortions, gestational age in weeks, parental ages at the time of miscarriage, pregnancy history of the patient after having the double trisomy abortion and origin of trisomies when determined. Three new double trisomy combinations were found in this study (48,XX+9+21, 48,XY+2+8 and 48,XX+20+22). Mean gestational age was  $9.4 \pm 2.1$  weeks, ranging from 7 to 13 weeks of gestation. Mean maternal and paternal ages were  $39.7 \pm 3.4$  and  $43.4 \pm 8.7$  respectively. Although slightly increased, mean maternal age for double trisomy cases ( $39.7 \pm 3.4$ ) was not significantly different ( $P = 0.076$ ) from that for single trisomy cases in our cohort of patients ( $36.6 \pm 4.3$ ;  $n = 66$ ). Mosaicism and triple aneuploidy could be discarded in the seven cases as a large number of metaphases could be analysed. Parental karyotypes were only studied for case 6, resulting in apparently normal 46,XX and 46,XY respectively, at a resolution level of 550 bands.

Material for DNA extraction was not available for cases 1, 4 and 5. Cases 2, 3, 6 and 7 could be studied by molecular techniques [additional Figures of multiplex QF-PCR for cases 2 and 6 have been published elsewhere (Diego-Alvarez *et al.*, 2005), available upon request]. Parental DNA was also available for those cases, so QF-PCR with STR markers was performed in order to determine both parental and cell stage origin of the additional chromosomes involved in the double aneuploidy by comparing the inherited alleles and their relative doses. Maternal origin could be established in cases 2, 3, 6 and 7, MI being inferred as the meiotic stage of error for cases 2 and 3, and MII for case 6. In case 7, MI was presumed for trisomy 22 and MII for trisomy 18 (Figure 1). Mitotic origin could be discarded for the trisomies as a triallelic pattern was present for at least one marker of the studied chromosomes.

MLPA with the SALSA-P070 Probe-mix was performed in cases 2, 3, 6 and 7 (Figure 2). Each trisomy was detected as a  $\geq 1.3$ -fold increase in relative peak area of both of the amplified probes (one for each chromosomal subtelomere) compared with those of the control sample. No false negative results were obtained, being in accordance with cytogenetic results.

## Discussion

We report seven cases of double trisomy among 321 karyotyped SA (2.18%). The reported frequency for double trisomy cases





ranges from 0.21 to 2.8% in studies not restricted to first trimester abortions. Our frequency is therefore within the reported range in other studies. A survey performed by Gueneri *et al.* (1987) of 202 first trimester-only loss villus samples found double trisomy in 5.8% of the cases. In the present study, gestational age of karyotyped miscarriages ranged from 4 to 24 weeks. The mean gestational age for double trisomy cases was  $9.4 \pm 2.1$ . The pooled mean based on other studies is  $8.7 \pm 2.2$  (Carr, 1967; Lauritsen, 1976; Creasy *et al.*, 1976; Takahara *et al.*, 1977; Kajiji *et al.*, 1980; Hassold *et al.*, 1980; Lin *et al.*, 1985; Eiben *et al.*, 1990; Zhou, 1990; Ohno *et al.*, 1991; Warburton *et al.*, 1991; Dejmek *et al.*, 1992; Gardo and Bajnoczky, 1992; Kalousek *et al.*, 1993; Reddy, 1997). The slight increase on the mean gestational age observed in this study might be due to the low number of miscarriages included. It has also been proven that double trisomies are aborted significantly earlier than single trisomies, excluding those that go to term (Reddy, 1997). If it is considered that ~65% of all conceptions and 10% of clinically recognized pregnancies end in fetal loss (Miller *et al.*, 1980;

Warburton *et al.*, 1980; Santalo *et al.*, 1987), this would suggest that the expected frequency of double trisomy among very early SA might be higher than the observed one, as demonstrated by Guerneri *et al.* (1987). Moreover, some authors have suggested that double aneuploidy might be more frequent than expected by multiplying the individual frequencies (Mikkelsen *et al.*, 1976), contrary to what is expected by chance. This possibly increased frequency might be explained by an individual tendency to non-disjunction.

Trisomy for every chromosome has been observed in aborted embryos, either constitutional, confined to placental tissues or in a mosaic state in the embryo. The most frequently reported are 13–16, 18, 21 and 22 ones. No double trisomies involving chromosomes 1, 3 and 19 have been reported (see Table II) and only tetrasomy for chromosome 21 has been observed. Acrocentric chromosomes appear frequently in multiple cases with a particular double trisomy and also partner a wide range of chromosomes (Reddy, 1997). Several combinations do appear more frequently than others, such as those

**Table II.** Chromosomal combinations in the reported double trisomies<sup>a</sup> (modified from Reddy, 1997)

[illegible]

Total number of cases: 178. The total number of cases with double trisomy is 178 (number of reports of each combination is given in the grid). x- and y-axes represent chromosome number.

<sup>a</sup>Lehmann and Forssman (1960); Uchida *et al.* (1962); Carr (1967); Lauritsen *et al.* (1972); Creasy *et al.* (1976); Takahara *et al.* (1977); Hassold *et al.* (1980); Kajii *et al.* (1980); Byrne *et al.* (1985); Lin *et al.* (1985); Guerneri *et al.* (1987); Kalousek (1987); Eiben *et al.* (1990); Zatti (1990); Zhou (1990); Lorda-Sanchez *et al.* (1991); Ohno *et al.* (1991); Warburton *et al.* (1991); Dejmek *et al.* (1992); Gardo and Bajnoczky (1992); Kalousek *et al.* (1993); Park *et al.* (1995); Hanna *et al.* (1996); Reddy (1997); Swarna *et al.* (1998); Robinson *et al.* (2001); van Huizen *et al.* (2004); Iliopoulos *et al.* (2004); Li *et al.* (2004 (2005); Rossino and Nucaro (2005); the present study. Additional considered cases appear and are referenced in the review by Li *et al.* (2004).

#: number of times that each chromosome appears in double trisomy (sex chromosomes X and Y have not been computed separately).



involving chromosomes 2 and 16, 16 and 21, 18 and 21 (1.7% each) and those found in liveborns involving a 13, 18 or 21 autosome and a sexual chromosome (1.7%, 9.0% and 9.9% respectively). This would suggest that non-viability of conceptions carrying a double trisomy would depend on which chromosomes are involved in the aneuploidy, either because of a more or less severe gene dosage imbalance or due to epigenetic factors such as genomic imprinting (differential expression of genes depending on parental origin).

Morphological examination of double trisomic specimens tends to reveal empty sacs (Reddy, 1997) but occasionally some of these develop into embryos with localized defects (Creasy *et al.*, 1976; Takahara *et al.*, 1977; Byrne *et al.*, 1985; Kalousek *et al.*, 1993). Cases 1–5 of our study were accompanied by no detail of their morphology. Case 6 was an anembryonic gestation. Case 7 (48,XXX+18) was diagnosed as hydrops fetalis. Unfortunately, no more clinical manifestations were studied in this case.

Abnormal chromosome complements are found in ~20% of unfertilized oocytes and in 2–5% of spermatocytes (Martin *et al.*, 1991). Despite maternal MI non-disjunction seeming to be the major cause of the whole single trisomy cases, chromosome-specific patterns do exist and a possible mitotic origin should also be considered. While most non-mosaic single trisomies involving any of the acrocentric chromosomes (13–15, 21 and 22) and chromosome 16 can be attributed to maternal MI errors (Hassold *et al.*, 1996; Koehler *et al.*, 1996), trisomy 18 is mostly associated with those occurring in maternal MII (MacDonald *et al.*, 1994; Fisher *et al.*, 1995). Among maternal origin cases, only 5–15% of trisomy 15, 18 and 21 cases seem to be of mitotic origin. Complete trisomy 8 of meiotic origin has been found only in SA and does not seem compatible with a continuing pregnancy. In contrast, a mitotic origin for trisomy 8 has been documented in one complete trisomic live-born (James and Jacobs, 1996) and in 12 of 13 mosaic liveborn cases (DeBrasi *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 1995; James and Jacobs, 1996; Seghezzi *et al.*, 1996). Paternal errors of meiotic origin are relatively rare and comprise ~10% of the total meiotic errors involving acrocentric chromosomes (Robinson *et al.*, 1999). Moreover, paternal meiotic errors have never been observed for trisomy 16 (Hassold *et al.*, 1995) and only rarely for trisomy 18 (Eggermann *et al.*, 1996; Bugge *et al.*, 1998). Our results are consistent with previous findings for those cases in which origin of the additional chromosomes could be determined. Maternal MI errors are presumed for cases 2 (48,XX+15+22) and 3 (48,XX+8+21), while maternal MII seems to be responsible for case 6 (48,XXX+18). Regarding case 7 (48,XY+18+22) and according to molecular results (Figure 1), a maternal error is responsible for double trisomy, but non-disjunction of homologues (MI) might have occurred for chromosome 22, and non-disjunction of chromatids (MII) could have occurred for chromosome 18. This case shows that two non-disjunction events involving two different chromosomes could occur in different cell divisions forming the gametes, following the same chromosome-specific patterns for missegregation described for single trisomy. These results suggest that a common maternal age-related mechanism could be implicated in both single and double trisomy.

Advanced maternal age remains the ultimate demonstrated risk factor for trisomic pregnancies (Hassold and Chiu, 1985). It has also been demonstrated that maternal age in double trisomy cases is significantly higher than that for single trisomy cases (Reddy, 1997; Li *et al.*, 2005). This may mean that errors in meiosis leading to multiple aneuploidy are more prone to occur in oocytes as women age. In fact, the relatively high frequency of double trisomy cases in this study (2.18%) may be a consequence in part of the advanced age of our cohort of patients bearing a double trisomic pregnancy [ $39.7 \pm 3.4$  compared to the pooled values of  $34.1 \pm 5.7$  in Reddy's (1997) study]. The fact that maternal age for double trisomy cases is not significantly different from that for single trisomy cases in our study ( $P = 0.076$ ) might be due to the reduced size of the sample.

Prognosis for patients after having a trisomic miscarriage is favourable; nevertheless, the risk of trisomic pregnancies with advanced maternal age should be considered (Warburton *et al.*, 1987). In contrast, a poor prognosis is found in patients having had an euploid miscarriage, suggesting that alternative causes of miscarriage may exist, such as variants in proteins affecting DNA methylation or meiotic segregation (Robinson *et al.*, 2001), gonadal mosaicism for a chromosome abnormality or balanced translocations (Sugiura-Ogasawara *et al.*, 2004; Lorda-Sanchez *et al.*, 2005). In our study, five out of the seven couples had had at least one previous miscarriage before the double trisomy miscarriage, but unfortunately, no information about the previous fetal losses was available. Information about pregnancies after the double trisomic miscarriage could be obtained in cases 2 and 5. In case 2, a pregnancy loss at 8 weeks of gestation 1 year after the double trisomic miscarriage was followed by the delivery of a healthy newborn 2 years later. In case 5, one pregnancy ended in a healthy child 1 year later and two more fetal losses occurred 3 and 4 years later respectively after that. Although no conclusions can be drawn in this respect, because no karyotype was available, fetal losses could be theoretically attributable to the increased risk of having a trisomic conceptus owing to the advanced maternal age (>37 years in both cases). Parental karyotypes were only available for case 6, which were normal at a resolution level of 550 bands. Nevertheless, a similar counselling could be offered to those couples having a single trisomic conception.

Cytogenetic study of miscarriages entails a high rate of culture failure because of yeast or bacterial infection or due to the poor growth of macerated specimens in culture. Moreover, when maternal cell contamination is present in the sample it often leads to wrong normal female karyotypes (Bell *et al.*, 1999). The main advantage of molecular techniques is that DNA is usually easy to obtain from products of conception rather than the need for live cells. Comparative genomic hybridization (CGH) has been demonstrated to detect numerical chromosome imbalances even in paraffin-embedded miscarriage tissues (Bell *et al.*, 2001; Fritz *et al.*, 2001; Tabet *et al.*, 2001), and moreover at a resolution level of 10–100 kb (Schaeffer *et al.*, 2004). QF-PCR ensures the fetal origin of the collected tissue and also permits determination of the parental and cell stage origin of the aneuploidy, studying the inherited chromosomes by comparing parental and fetal DNA STR markers. A recent study conducted by Benkhalifa *et al.* (2005)

has been performed on 26 SA that failed to grow in culture. Array CGH revealed chromosomal abnormalities uncommonly seen by classic cytogenetics, including high rates of double aneuploidy and autosomal monosomy. They suggest that conventional cytogenetics may yield normal karyotypes or only those abnormal karyotypes that permit cell proliferation *in vitro*. Regarding the MLPA technique, it has been proven to detect the most common aneuploidies on amniotic fluid cells and chorionic villi in prenatal diagnosis (Slater *et al.*, 2003; Gerdes *et al.*, 2004), but no reports of its application in SA have been published until now. The main advantage of this technique is that aneuploidy for every chromosome can be screened in a single experiment requiring only 20 ng of genomic DNA. Moreover, its costs are relatively low compared to the high and still unaffordable costs of array CGH for the majority of diagnostic laboratories. This makes the technique ideal for the detection of single and multiple aneuploidy among very early SA in which very little material is obtained or in those specimens which failed to grow in culture. In our study, MLPA results agree with those obtained by karyotyping and QF-PCR. Nonetheless, reliability of this technique for the detection of numerical chromosome imbalances in spontaneous miscarriages will be further evaluated elsewhere (Diego-Alvarez D *et al.*, manuscript in preparation).

Results in our study suggest that a common maternal age-related mechanism could be implicated in both single and double trisomy cases, and that meiotic errors could cause similar chromosome-specific patterns for missegregation that occur in single trisomy. Considering the fact that different prognoses have been found in patients after having a trisomic or an euploid abortion, we recommend performing both cytogenetic and molecular studies even in the case of the first spontaneous abortion because of the importance at that time of offering appropriate genetic counselling. Moreover, determination of parental origin and stage of error of the aneuploidy by molecular techniques will be helpful not only for this purpose, but also to better understand the aetiology and biological mechanisms underlying human aneuploidy.

## Acknowledgements

The authors thank collaborating volunteer couples and everyone at the Genetics Service of Fundación Jiménez Díaz, specially to Rocío Cardero. Dan Diego-Alvarez is sponsored by Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz. This research was supported by a grant from FIS (02/0068) and Red INERGEN (FIS C03/05).

## References

- Adinolfi M, Pertl B and Sherlock J (1997) Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat Diagn* 17,1299–1311.
- Bell KA, Van Deerlin PG, Haddad BR and Feinberg RF (1999) Cytogenetic diagnosis of "normal 46,XX" karyotypes in spontaneous abortions frequently may be misleading. *Fertil Steril* 71,334–341.
- Bell KA, Van Deerlin PG, Feinberg RF, du Manoir S and Haddad BR (2001) Diagnosis of aneuploidy in archival, paraffin-embedded pregnancy-loss tissues by comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* 75,374–379.
- Benkhalifa M, Kasakyan S, Clement P, Baldi M, Tachdjian G, Demiroglu A, Gurgan T, Fiorentino F, Mohammed M and Qumsiyeh MB (2005) Array comparative genomic hybridization profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro. *Prenat Diagn* 25(10),894–900.
- Bugge M, Collins A, Petersen MB, Fisher J, Brandt C, Hertz JM, Tranebjærg L, de Lozier-Blanchet C, Nicolaides P, Brondum-Nielsen K, Morton N and Mikkelsen M (1998) Non-disjunction of chromosome 18. *Hum Mol Genet* 7,661–669.
- Byrne J, Warburton D, Kline J, Blanc W and Stein Z (1985) Morphology of early fetal deaths and their chromosomal characteristics. *Teratology* 32,297–315.
- Carr DH (1967) Chromosome anomalies as a cause of spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 97,283–293.
- Chakravarti A (1989) The probability of detecting the origin of nondisjunction of autosomal trisomies. *Am J Hum Genet* 44,639–645.
- Chakravarti A and Slaugenhaupt SA (1987) Methods for studying recombination on chromosomes that undergo nondisjunction. *Genomics* 1,35–42.
- Creasy MR, Crolla JA and Alberman ED (1976) A cytogenetic study of human spontaneous abortions using banding techniques. *Hum Genet* 31,177–196.
- DeBrasi D, Genardi M, D'Agostino A, Calvieri F, Tozzi C, Varrone S and Neri G (1995) Double autosomal/gonosomal mosaic aneuploidy: study of nondisjunction in two cases with trisomy of chromosome 8. *Hum Genet* 95,519–525.
- Dejmeck J, Vojtassak J and Malova J (1992) Cytogenetic analysis of 1508 spontaneous abortions originating from south Slovakia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 46,129–136.
- Diego-Alvarez D, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, Gonzalez-Gonzalez C, Rodriguez de Alba M, Ayuso C, Ramos-Corrales C and Lorda-Sanchez I (2005) Application of quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages. *Hum Reprod* 20,1235–1243.
- Eggermann T, Nothen MM, Eiben B, Hofmann D, Hinkel K, Fimmers R and Schwanitz G (1996) Trisomy of human chromosome 18: molecular studies on parental origin and cell stage of nondisjunction. *Hum Genet* 97,218–223.
- Eiben B, Bartels I, Bahr-Porsch S, Borgmann S, Gatz G, Gellert G, Goebel R, Hammans W, Hentemann M, Osmers R *et al* (1990) Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am J Hum Genet* 47,656–663.
- Fisher JM, Harvey JF, Morton NE and Jacobs PA (1995) Trisomy 18: studies of the parent and cell division of origin and the effect of aberrant recombination on nondisjunction. *Am J Hum Genet* 56,669–675.
- Fritz B, Hallermann C, Olert J, Fuchs B, Bruns M, Aslan M, Schmidt S, Coerdts W, Muntefering H and Rehder H (2001) Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH)-Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *Eur J Hum Genet* 9,539–547.
- Gardo S and Bajnoczky K (1992) Cytogenetic analysis of spontaneous abortions with direct analysis of chorionic villi. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 47,117–120.
- Gerdes T, Kirchhoff M, Lind AM, Larsen GV, Schwartz M and Lundsteen C (2004) Computer-assisted prenatal aneuploidy screening for chromosome 13, 18, 21, X and Y based on multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Eur J Hum Genet* 13,171–175.
- Guerneri S, Bettio D, Simoni G, Brambati B, Lanzani A and Fraccaro M (1987) Prevalence and distribution of chromosome abnormalities in a sample of first trimester internal abortions. *Hum Reprod* 2,735–739.
- Hanna JS, Neu RL and Lockwood DH (1996) Prenatal cytogenetic results from cases referred for 44 different types of abnormal ultrasound findings. *Prenat Diagn* 16,109–115.
- Hassold T and Chiu D (1985) Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet* 70,11–17.
- Hassold T and Jacobs P (1984) Trisomy in man. *Annu Rev Genet* 18,69–97.
- Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, Matsuyama A, Wilson C, Yamane JA and Jacobs PA (1980) A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* 44 (Pt 2),151–178.
- Hassold T, Merrill M, Adkins K, Freeman S and Sherman S (1995) Recombination and maternal age-dependent nondisjunction: molecular studies of trisomy 16. *Am J Hum Genet* 57,867–874.
- Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, Saker D, Shen J and Zaragoza M (1996) Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. *Environ Mol Mutagen* 28,167–175.
- Iliopoulos D, Poultsides G, Peristeri V, Kouri G, Andreou A and Voyiatzis N (2004) Double trisomy (48,XXY,+21) in monozygotic twins: case report and review of the literature. *Ann Genet* 47,95–98.
- James RS and Jacobs PA (1996) Molecular studies of the aetiology of trisomy 8 in spontaneous abortions and the liveborn population. *Hum Genet* 97,283–286.
- Kajii T, Ferrier A, Niikawa N, Takahara H, Ohama K and Avirachan S (1980) Anatomic and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses. *Hum Genet* 55,87–98.

- Kalousek DK (1987) Anatomic and chromosome anomalies in specimens of early spontaneous abortion: seven-year experience. *Birth Defects Orig Artic Ser* 23,153–168.
- Kalousek DK, Pantzar T, Tsai M and Paradise B (1993) Early spontaneous abortion: morphologic and karyotypic findings in 3,912 cases. *Birth Defects Orig Artic Ser* 29,53–61.
- Koehler KE, Hawley RS, Sherman S and Hassold T (1996) Recombination and nondisjunction in humans and flies. *Hum Mol Genet* 5(Special Number), 1495–1504.
- Lauritsen JG (1976) Aetiology of spontaneous abortion. A cytogenetic and epidemiological study of 288 abortuses and their parents. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 52,1–29.
- Lauritsen JG, Jonasson J, Therkelsen AJ, Lass F, Lindsten J and Petersen GB (1972) Studies on spontaneous abortions. Fluorescence analysis of abnormal karyotypes. *Hereditas* 71,160–163.
- Lehmann O and Forssman H (1960) Klinefelter's syndrome and mongolism in the same person. *Acta Paediatr* 49,536–539.
- Li QY, Tsukishiro S, Nakagawa C, Tanemura M, Sugiura-Ogasawara M, Suzumori K and Sonta S (2005) Parental origin and cell stage of non-disjunction of double trisomy in spontaneous abortion. *Congenit Anom (Kyoto)* 45,21–25.
- Li S, Hassed S, Mulvihill JJ, Nair AK and Hopcus DJ (2004) Double trisomy. *Am J Med Genet A* 124,96–98.
- Lin CC, De Braekeleer M and Jamro H (1985) Cytogenetic studies in spontaneous abortion: the Calgary experience. *Can J Genet Cytol* 27,565–570.
- Lorda-Sanchez I, Petersen MB, Binkert F, Maechler M, Schmid W, Adelsberger PA, Antonarakis SE and Schinzel A (1991) A 48,XXY,+21 Down syndrome patient with additional paternal X and maternal 21. *Hum Genet* 87,54–56.
- Lorda-Sanchez I, Diego-Alvarez D, Ayuso C, de Alba MR, Trujillo MJ, Ramos C (2005) Trisomy 2 due to a 3:1 segregation in an abortion studied by QF-PCR and CGH. *Prenat Diagn* 25,934–938.
- MacDonald M, Hassold T, Harvey J, Wang LH, Morton NE and Jacobs P (1994) The origin of 47,XXY and 47,XXX aneuploidy: heterogeneous mechanisms and role of aberrant recombination. *Hum Mol Genet* 3, 1365–1371.
- Martin RH, Ko E and Rademaker A (1991) Distribution of aneuploidy in human gametes: comparison between human sperm and oocytes. *Am J Med Genet* 39,321–331.
- Mikkelsen M, Fischer G, Stene J, Stene E and Petersen E (1976) Incidence study of Down's syndrome in Copenhagen, 1960–1971; with chromosome investigation. *Ann Hum Genet* 40,177–182.
- Miller JF, Williamson E, Glue J, Gordon YB, Grudzinskas JG and Sykes A (1980) Fetal loss after implantation. A prospective study. *Lancet* 2(8194),554–556.
- Nagaishi M, Yamamoto T, Iinuma K, Shimomura K, Berend SA and Knops J (2004) Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan. *J Obstet Gynaecol Res* 30(3), 237–241.
- Nicolaidis P and Petersen MB (1998) Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod* 13,313–319.
- Ohno M, Maeda T and Matsunobu A (1991) A cytogenetic study of spontaneous abortions with direct analysis of chorionic villi. *Obstet Gynecol* 77, 394–398.
- Park VM, Bravo RR and Shulman LP (1995) Double non-disjunction in maternal meiosis II giving rise to a fetus with 48,XXX,+21. *J Med Genet* 32,650–653.
- Reddy KS (1997) Double trisomy in spontaneous abortions. *Hum Genet* 101,339–345.
- Robinson WP, Bernasconi F, Mutirangura A, Ledbetter DH, Langlois S, Malcolm S, Morris MA and Schinzel AA (1993) Nondisjunction of chromosome 15: origin and recombination. *Am J Hum Genet* 53,740–751.
- Robinson WP, Binkert F, Bernasconi F, Lorda-Sanchez I, Werder EA and Schinzel AA (1995) Molecular studies of chromosomal mosaicism: relative frequency of chromosome gain or loss and possible role of cell selection. *Am J Hum Genet* 56,444–451.
- Robinson WP, Bernasconi F, Lau A and McFadden DE (1999) Frequency of meiotic trisomy depends on involved chromosome and mode of ascertainment. *Am J Med Genet* 84,34–42.
- Robinson WP, McFadden DE and Stephenson MD (2001) The origin of abnormalities in recurrent aneuploidy/polyploidy. *Am J Hum Genet* 69,1245–1254.
- Rossino R and Nucaro AL (2005) Prenatal diagnosis of a double trisomy 48,XXY,+13: Klinefelter and Patau syndromes. *Am J Med Genet A* 132,342.
- Santalo J, Badenas J, Catala V and Egozcue J (1987) Chromosomes of mouse embryos in vivo and in vitro: effect of manipulation, maternal age and gamete ageing. *Hum Reprod* 2,717–719.
- Schaeffer AJ, Chung J, Heretis K, Wong A, Ledbetter DH and Lese Martin C (2004) Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages. *Am J Hum Genet* 74,1168–1174.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaier R, Zwijnenburg D, Diepvens F and Pals G (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30,e57.
- Seghezzi L, Maserati E, Minelli A, Dellavecchia C, Addis P, Locatelli F, Angioni A, Balloni P, Miano C, Cavalli P, Danesino C and Pasquali F (1996) Constitutional trisomy 8 as first mutation in multistep carcinogenesis: clinical, cytogenetic, and molecular data on three cases. *Genes Chromosomes Cancer* 17,94–101.
- Slater HR, Bruno DL, Ren H, Pertile M, Schouten JP and Choo KH (2003) Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). *J Med Genet* 40,907–912.
- Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sato T, Suzumori N and Suzumori K (2004) Poor prognosis of recurrent aborters with either maternal or paternal reciprocal translocations. *Fertil Steril* 81,367–373.
- Swarna K, Gogineni MD and Verma RS (1998) An abortus with double trisomy (48,XY,+4+7). *Am J Obstet Gynecol* 179,1654.
- Tabet AC, Aboura A, Dauge MC, Audibert F, Coulomb A, Batallan A, Couturier-Turpin MH, Feldmann G and Tachdjian G (2001) Cytogenetic analysis of trophoblasts by comparative genomic hybridization in embryo-fetal development anomalies. *Prenat Diagn* 21,613–618.
- Takahara H, Ohama K and Fujiwara A (1977) Cytogenetic study in early spontaneous abortion. *Hiroshima J Med Sci* 26,291–296.
- Uchida IA, Lewis AJ, Bowman JM and Wang HC (1962) A case of double trisomy: trisomy No. 18 and triplo-X. *J Pediatr* 60,498–502.
- van Huizen ME, Knecht AC, Bijlsma EK and Bilardo CM (2004) Double trisomy 48,XXX,+18 in association with increased nuchal translucency; two cases. *Prenat Diagn* 24,1020–1021.
- Warburton D, Stein Z, Kline J, Susser M *et al* (1980) Chromosome abnormalities in spontaneous abortion: data from the New York City study. In Porter IH and Hook EB (eds) *Human Embryonic and Fetal Death*. Academic Press, New York, pp 261–287.
- Warburton D, Kline J, Stein Z, Hutzler M, Chin A and Hassold T (1987) Does the karyotype of a spontaneous abortion predict the karyotype of a subsequent abortion? Evidence from 273 women with two karyotyped spontaneous abortions. *Am J Hum Genet* 41,465–483.
- Warburton D, Byrne J and Canki N (1991) Chromosome anomalies and prenatal development: an atlas. *Oxf Monogr Med Genet* 21,57–100.
- World Medical Organization (1996) Declaration of Helsinki 1964. *Br Med J* 313,1448–1449.
- Zaragoza MV, Jacobs PA, James RS, Rogan P, Sherman S and Hassold T (1994) Nondisjunction of human acrocentric chromosomes: studies of 432 trisomic fetuses and liveborns. *Hum Genet* 94,411–417.
- Zatti N (1990) A case of spontaneous abortion with double trisomy 48,XX,+16,+22. *Gazz Med Ital Arch Sci Med* 149,43–44.
- Zhou CR (1990) Cytogenetic studies of spontaneous abortions in humans. *Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih* 25,89–91.

*Submitted on August 30, 2005; resubmitted on October 20, 2005; accepted on November 1, 2005*

# MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages

Dan Diego-Alvarez<sup>1\*</sup>, Marta Rodriguez de Alba<sup>1</sup>, Rocio Cardero-Merlo<sup>1</sup>, Joaquin Diaz-Recasens<sup>2</sup>, Carmen Ayuso<sup>1</sup>, Carmen Ramos<sup>1</sup> and Isabel Lorda-Sanchez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genetics Service, Fundación Jiménez Díaz—CIBERER, Spain

<sup>2</sup>Obstetrics and Gynaecology Service, Fundación Jiménez Díaz, Spain

**Objective** The present study aims to validate multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) technique with subtelomeric probe mixes as a screening method to detect aneuploidy and unbalanced terminal chromosomal rearrangements in spontaneous abortions (SAs).

**Methods** MLPA with P036B and P070 probe mixes was performed on 221 miscarriage DNA samples between the 5th and 24th week of gestation. Cytogenetic culture was attempted on 178 miscarriages. Karyotyped miscarriages served as controls in this blinded study. Results were confirmed by quantitative fluorescent-PCR (QF-PCR).

**Results** Among the karyotyped miscarriages, MLPA was able to detect all the expected aneuploidies, as well as an unbalanced product from a reciprocal translocation, and revealed cryptic deletions and duplications not visible at the 550-band resolution level. In addition, chromosomal anomalies were found in ~37% of cases that failed to grow or could not be cultivated. As expected, ploidy changes were not detected. Copy number variation was found for target sequences of P036B (CYFIP1, MRPL41, CAB45) and P070 (DEC2, TNFRSF18) probe mixes.

**Conclusions** We propose the use of MLPA with subtelomeric probe mixes as a reliable, rapid and economical first approach to detect aneuploidy and unbalanced terminal chromosomal rearrangements in SAs. Copyright © 2007 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS: MLPA; aneuploidy; miscarriage; spontaneous abortion; QF-PCR

## INTRODUCTION

Routine cytogenetic study of miscarriages entails high rates of culture failure (10–40%) (Lomax *et al.*, 2000), misdiagnosis due to overgrowth of maternal cells and insufficient quality of chromosome preparations. Moreover, some authors support the hypothesis that cell culture may selectively yield normal karyotypes or certain abnormal karyotypes that still permit *in vitro* cell proliferation, suggesting that rates of abnormalities rarely seen by conventional cytogenetics may be more frequent than previously reported in the literature (Benkhalifa *et al.*, 2005).

On the other hand, molecular techniques such as quantitative fluorescent-PCR (QF-PCR) (Diego-Alvarez *et al.*, 2005), fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (Jobanputra *et al.*, 2002) and array comparative genomic hybridization (CGH) (Schaeffer *et al.*, 2004) have been proved to be reliable diagnostic methods in detecting aneuploidies and submicroscopic chromosomal imbalances in spontaneous miscarriages. Although QF-PCR and multiplex FISH are limited by the number of target chromosomes that can be tested per assay, array CGH remains an expensive technique not suitable for

routine diagnosis in many genetic services. In contrast to these techniques, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) (Schouten *et al.*, 2002) allows relative quantification of up to 46 different DNA sequences simultaneously in a rapid, economical, simple, and unique assay requiring only 20 ng of DNA. This enables the detection of copy number changes such as deletions (*del*) or duplications (*dup*). SALSA P036B and P070 probe mixes (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) contain different probes for subtelomeric regions of every chromosome as well as two probes for non-telomeric Y chromosome specific sequences. Therefore, aneuploidy might be suspected if probes for both arms of a chromosome appear deleted (monosomy) or duplicated (trisomy).

Although a pilot study assessing the use of MLPA to investigate chromosome abnormalities in spontaneous miscarriages has been recently published by Bruno *et al.* (2006), we were able to analyse an increased number of samples. This large study enabled an extensive evaluation of the applications and limitations of this technique for chromosomal studies of spontaneous miscarriages.

## MATERIAL AND METHODS

### Biological samples

A total of 221 miscarriages were included in the present study. Miscarriage samples were provided by

\*Correspondence to: Dan Diego-Alvarez, Servicio de Genética-Fundación Jiménez Díaz. Avda. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain. E-mail: ddiego@fjd.es

the Obstetrics and Gynaecology Service of Fundación Jiménez Díaz (Spain) and some private clinics from 1996 onwards. The samples consisted of chorionic villi, embryo or placental tissue obtained after delivery or surgical evacuation between the 5th and the 24th week of gestation. In the majority of cases, DNA from recognizable maternal deciduae remains was isolated to ensure the foetal origin of miscarriage DNA samples. When necessary and possible, blood samples of parents were requested in order to confirm results and to prove the parental origin of the anomaly. This study has been approved by the institutional ethical committee.

### Cytogenetic studies

Cell culture was attempted in 178 out of 221 specimens (tissue was either macerated or ethanol-fixed in the remaining 43). Selected material was dissected and washed in saline solution prior to culturing in order to avoid maternal cell contamination. Samples were cultivated with BIO-AMF-1 basal medium plus supplement (Biological Industries, Israel) containing HEPES 1 M, penicillin–streptomycin and L-glutamine 200 mM (GIBCO Invitrogen, CA, USA) following standard protocols. Chromosome preparations were G-banded using trypsin–Giemsa for karyotyping. A minimum of ten metaphases at the 500–550 band resolution level were routinely analysed per specimen. Karyotyped miscarriages served as controls in this blinded study.

### Molecular studies

DNA was isolated with the Tissue Kit for EZ1 BioRobot (QIAGEN, Hilden, Germany) after dissection of 10–15 mg of tissue and chemical digestion with proteinase K at 56 °C between 48 and 72 h following the supplied protocols. Molecular studies by QF–PCR with STR markers of chromosomes 13, 15, 16, 18, 21, 22, X and Y were performed in all the samples in order to exclude triploidy or aneuploidy for these chromosomes and to discard maternal DNA contamination as described elsewhere in detail (Diego–Alvarez *et al.*, 2005).

### MLPA

MLPA with SALSA P036B and P070 probe mixes (MRC-Holland) was performed in a GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as recommended by the manufacturer's protocol. PCR products were electrophoresed in an ABI Prism 3100 Genetic Analyser and analysed with the GeneMapper 3.5 software package (Applied Biosystems). Normalization of peak area values was achieved as recommended by the manufacturer. Sequence deletion or duplication was considered when a 35–50% variation of the relative peak area of the amplification product of the respective probe was obtained. If no concordant results between the two probe mixes were obtained, the assay was repeated. Whenever possible, results were confirmed by QF–PCR

with distinct STR markers or array CGH (1 Mb resolution) when a karyotype was not available or discordant results were obtained.

### RESULTS

MLPA was performed in 221 miscarriage DNA samples included in the present study. Karyotyping was achieved in 102 cases (Table 1). No karyotype could be obtained in the remaining 119 cases (Table 2) because of culture failure (75 cases), poor quality of chromosome preparations (1 case) or inappropriate state of the sample (macerated or ethanol-fixed) when received (43 cases).

Among karyotyped specimens (Table 1), a normal pattern for all probes was obtained in 50 normal abortions as well as in the 5 polyploid ones. Eight out of 36 normal female karyotypes (ab–27, ab–35, ab–59, ab–71, ab–84, ab–120, ab–191 and ab–192) seemed to be caused by preferential maternal cell growth in culture, which could be proven by microsatellite analyses. Trisomies were identified by duplication of both probes (corresponding to *p* and *q* arms) for each probe mix of the chromosome involved in the aneuploidy except for ab–48 (Table 1). Monosomy X was identified as deletion of X/Y probes. Duplication of 20p probes (partial trisomy) and deletion of 18q probes (partial monosomy) could be found in one abortion from a female carrier of an unbalanced translocation (Figure 1). Additional and/or discordant results obtained by MLPA in comparison to the karyotyped miscarriages are shown in the same table (see ab–1, ab–21 and ab–179).

Among the 119 miscarriages in which a karyotype could not be obtained (Table 2), a normal pattern for all probes was obtained in 68 cases. Deletion or duplication of only one probe was found in three of these cases (ab–166, ab–177 and ab–213). Fortyone cases revealed aneuploidy and 3 cases presented terminal deletions or duplications (ab–43, ab–89 and ab–210). In the remaining 4 cases (1.8%), no result could be concluded because of bad probe pattern of amplification.

Among the entire collection of samples, deletion or deletion of only one of the two probes of a chromosomal arm was observed in seven samples (see ab–10, ab–60, ab–166, ab–167, ab–175, ab–177 and ab–213, Tables 1 and 2). Regrettably, parental DNA was available only for ab–175, in which *dup* of 16p (DECR2) probe appeared to be a polymorphism inherited from the mother.

### DISCUSSION

In this study, MLPA with subtelomeric probe mixes (P036B and P070) was performed on 221 DNA miscarriage samples in order to assess its capability to detect numerical and unbalanced structural chromosome abnormalities. MLPA results obtained in karyotyped miscarriages demonstrated the capability of this technique to detect both unbalanced chromosomal rearrangements

Table 1—MLPA results in karyotyped miscarriages.\*

Karyotype	Samples	MLPA P036B results	MLPA P070 results
26 normal male (46,XY)	23 cases ab-1 ab-21 ab-60	Normal pattern for all probes; amplification of Y (UTY and DBY) probes <i>Del</i> of X/Yq (SYBL1) probe <i>Dup</i> of 16p (POLR3K) probe <i>Del</i> of 9q (MRPL41) probe	Normal pattern for all probes; amplification of Y (UTY and DBY) probes <i>Del</i> of X/Yq (SYBL1) probe <i>Dup</i> of 16p (DECR2) probe Normal pattern for all probes
36 normal female (46,XX)	27 cases ab-10 ab-27* ab-35* ab-59* ab-71* ab-84* ab-120* ab-191* ab-192*	Normal pattern for all probes <i>Dup</i> of '5p' (CYFIP1) probe <i>Dup</i> of '13p' (PSPC1) and 13q (F7) probes Amplification of Y (UTY and DBY) probes Amplification of Y (UTY and DBY) probes <i>Dup</i> of 17p (RPH3AL) and 17q (SECTM1) probes <i>Dup</i> of 8p (FBXO25), 8q (KIAA0150), '22p' (BID) and 22q (RABL2B) probes <i>Dup</i> of '22p' (BID) and 22q (RABL2B) probes <i>Dup</i> of '13p' (PSPC1) and 13q (F7) probes <i>Del</i> of X/Yp (SHOX) and X/Yq (SYBL1) probes	Normal pattern for all probes <i>Dup</i> of '13p' (PSPC1) and 13q (CDC16) probes Amplification of Y (UTY and DBY) probes Amplification of Y (UTY and DBY) probes <i>Dup</i> of 17p (RPH3AL) and 17q (SECTM1) probes <i>Dup</i> of 8p (FBXO25), 8q (RECQL4), '22p' (IL17R) and 22q (ARSA) probes <i>Dup</i> of '22p' (IL17R) and 22q (ARSA) probes <i>Dup</i> of '13p' (PSPC1) and 13q (CDC16) probes <i>Del</i> of X/Yp (SHOX) and X/Yq (SYBL1) probes
5 Polyploid 69,XXX 69,XXY 92,XXXX 92,XXXY	1 case 2 cases 1 case 1 case	Normal pattern for all probes Normal pattern for all probes; amplification of Y (UTY and DBY) probes Normal pattern for all probes Normal pattern for all probes; amplification of Y (UTY and DBY) probes	Normal pattern for all probes Normal pattern for all probes; amplification of Y (UTY and DBY) probes Normal pattern for all probes Normal pattern for all probes; amplification of Y (UTY and DBY) probes
34 aneuploid Trisomy 5 Trisomy 7 Trisomy 10 Trisomy 13  Trisomy 15 Trisomy 16 Trisomy 18 Trisomy 20 Trisomy 21 Trisomy 22 Double trisomy 15, 22 Double trisomy 8, 21 Double trisomy 18, 22 Double trisomy X, 18 Monosomy X (45,X)	1 case 2 cases 3 cases 2 cases ab-48  1 case 5 cases 3 cases ab-175 4 cases 1 case 1 case 1 case 1 case 1 case 4 cases ab-167 ab-179	<i>Dup</i> of 5p (PDCD6) and 5q (GNB2L1) probes <i>Dup</i> of 7p (CENTA1) and 7q (VIPR2) probes <i>Dup</i> of 10p (KIAA0934) and 10q (PAO) probes <i>Dup</i> of '13p' (PSPC1) and 13q (F7) probes Normal pattern for '13p' (PSPC1) probe and <i>dup</i> of 13q (F7) probe <i>Dup</i> of '15p' (CYFIP1) and 15q (ALDH1A3) probes <i>Dup</i> of 16p (POLR3K) and 16q (GAS1/GAS8) probes <i>Dup</i> of 18p (USP14) and 18q (FLJ21172) probes <i>Dup</i> of 20p (SOX12) and 20q (OPRL1) probes <i>Dup</i> of '21p' (RBM11) and 21q (HMT1) probes <i>Dup</i> of '22p' (BID) and 22q (RABL2B) probes <i>Dup</i> of '15p' (CYFIP1), 15q (ALDH1A3), '22p' (BID) and 22q (RABL2B) probes <i>Dup</i> of 8p (FBXO25), 8q (KIAA0150), '21p' (RBM11) and 21q (HMT1) probes <i>Dup</i> of 18p (USP14), 18q (FLJ21172), '22p' (BID) and 22q (RABL2B) probes <i>Dup</i> of 18p (USP14), 18q (FLJ21172), X/Yp (SHOX) and X/Yq (SYBL1) probes <i>Del</i> of X/Yp (SHOX) and X/Yq (SYBL1) probes <i>Del</i> of X/Yp (SHOX) and X/Yq (SYBL1) probes <i>Del</i> of X/Yp (SHOX) and X/Yq (SYBL1) probes <i>Dup</i> of 20p (SOX12) and <i>del</i> of 18q (FLJ21172) probes	<i>Dup</i> of 5p (LOC133957) and 5q (GNB2L1) probes <i>Dup</i> of 7p (UNC84A) and 7q (VIPR2) probes <i>Dup</i> of 10p (BS69) and 10q (ECHS1) probes <i>Dup</i> of '13p' (PSPC1) and 13q (CDC16) probes <i>Dup</i> of '13p' (PSPC1) and 13q (CDC16) probes <i>Dup</i> of '15p' (NDN) and 15q (FLJ22604) probes <i>Dup</i> of 16p (DECR2) and 16q (GAS1) probes <i>Dup</i> of 18p (THOC1) and 18q (CTDP1) probes <i>Dup</i> of 16p (DECR2), 20p (FLJ22115) and 20q (FLJ20517) probes <i>Dup</i> of '21p' (STCH) and 21q (S100B) probes <i>Dup</i> of '22p' (IL17R) and 22q (ARSA) probes <i>Dup</i> of '15p' (NDN), 15q (FLJ22604), '22p' (IL17R) and 22q (ARSA) probes <i>Dup</i> of 8p (FBXO25), 8q (RECQL4), '21p' (STCH) and 21q (S100B) probes <i>Dup</i> of 18p (THOC1), 18q (CTDP1), '22p' (IL17R) and 22q (ARSA) probes <i>Dup</i> of 18p (THOC1), 18q (CTDP1), X/Yp (SHOX) and X/Yq (SYBL1) probes <i>Del</i> of X/Yp (SHOX) and X/Yq (SYBL1) probes <i>Dup</i> of 1p (NFRSF18) probe and <i>del</i> of X/Yp (SHOX) and X/Yq (SYBL1) probes <i>Del</i> of X/Yq (SYBL1) probes <i>Dup</i> of 20p (FLJ22115) and <i>del</i> of 18q (CTDP1) probes
One structurally abnormal 46,XY,der(18)t(18;20)(q21;p13)mat Total number of cases	ab-69 102	—	—

\* Cases with normal female karyotype due to overgrowth of maternal cell contamination in culture

Table 2—MLPA results in non-karyotyped miscarriages

Samples	MLPA P036B results	MLPA P070 results	Interpretation of results (assumed karyotype)	Follow-up/validation
35 cases	Normal pattern for all probes	Normal pattern for all probes	Normal female (not distinguishable from polyploidy)	QF-PCR detected 7 triploid (69,XXX) cases
33 cases	Normal pattern for all probes; amplification of Y (UTY and DBY) probes	Normal pattern for all probes; amplification of Y (UTY and DBY) probes	Normal male (not distinguishable from polyploidy)	QF-PCR detected 4 triploid (69,XXY) cases
ab-166	Normal pattern for all probes	<i>Dup</i> of 16p (DEC2R2) probe	Possible polymorphism	Not possible
ab-177	Normal pattern for all probes	<i>Dup</i> of 16p (DEC2R2) probe	Possible polymorphism	Not possible
ab-213	<i>Del</i> of 1p (CAB45) probe	Normal pattern for all probes	Possible polymorphism	Not possible
2 cases	<i>Dup</i> of 2p (ACP1) and 2q (CAPN10) probes	<i>Dup</i> of 2p (ACP1) and 2q (APG4B) probes	Aneuploid, trisomy 2	QF-PCR
1 case	<i>Dup</i> of 3p (CHL1) and 3q (BDH) probes	<i>Dup</i> of 3p (CHL1) and 3q (KIAA0226) probes	Aneuploid, trisomy 3	QF-PCR
3 cases	<i>Dup</i> of 7p (CENTA1) and 7q (VIPR2) probes	<i>Dup</i> of 7p (UNC84A) and 7q (VIPR2) probes	Aneuploid, trisomy 7	QF-PCR
3 cases	<i>Dup</i> of 9p (DMRT1) and 9q (MRPL41) probes	<i>Dup</i> of 9p (FLJ00026) and 9q (EU-HMTase1) probes	Aneuploid, trisomy 9	QF-PCR
4 cases	<i>Dup</i> of '13p' (PSPC1) and 13q (F7) probes	<i>Dup</i> of '13p' (PSPC1) and 13q (CDC16) probes	Aneuploid, trisomy 13	QF-PCR
1 case	<i>Dup</i> of '14p' (HEI10) and 14q (MTA1) probes	<i>Dup</i> of '14p' (ADPRTL2) and 14q (MTA1) probes	Aneuploid, trisomy 14	QF-PCR
5 cases	<i>Dup</i> of '15p' (CYFIP1) and 15q (ALDH1A3) probes	<i>Dup</i> of '15p' (NDN) and 15q (FLJ22604) probes	Aneuploid, trisomy 15	QF-PCR
5 cases	<i>Dup</i> of 16p (POLR3K) and 16q (GAS11/GAS8) probes	<i>Dup</i> of 16p (DEC2R2) and 16q (GAS11) probes	Aneuploid, trisomy 16	QF-PCR
2 cases	<i>Dup</i> of 18p (USP14) and 18q (FLJ21172) probes	<i>Dup</i> of 18p (THOC1) and 18q (CTDP1) probes	Aneuploid, trisomy 18	QF-PCR
5 cases	<i>Dup</i> of '21p' (RBM11) and 21q (HMT1) probes	<i>Dup</i> of '21p' (STCH) and 21q (S100B) probes	Aneuploid, trisomy 21	QF-PCR
5 cases	<i>Dup</i> of '22p' (BID) and 22q (RABL2B) probes	<i>Dup</i> of '22p' (IL17R) and 22q (ARSA) probes	Aneuploid, trisomy 22	QF-PCR
1 case	<i>Dup</i> of X/Yp (SHOX) and X/Yq (SYBL1) probes; amplification of Y (UTY and DBY) probes	<i>Dup</i> of X/Yp (SHOX) and X/Yq (SYBL1) probes; amplification of Y (UTY and DBY) probes	Aneuploid, Klinefelter (XXY)	QF-PCR
3 cases	<i>Del</i> of X/Yp (SHOX) and X/Yq (SYBL1) probes	<i>Del</i> of X/Yp (SHOX) and X/Yq (SYBL1) probes	Aneuploid, monosomy X (45,X)	QF-PCR
ab-30	<i>Dup</i> of X/Yp (SHOX), 18p (USP14) and 18q (FLJ21172) probes	<i>Dup</i> of X/Yp (SHOX), 18p (THOC1) and 18q (CTDP1) probes	Complex rearrangement: X/Yp <i>dup</i> in addition to trisomy 18	Trisomy 18 was confirmed by QF-PCR, X/Yp <i>dup</i> not confirmed yet
ab-43	<i>Dup</i> of 21q (HMT1) probe	<i>Dup</i> of 21q (S100B) probe	21q <i>dup</i>	Not confirmed yet
ab-89	<i>Del</i> of 6q (PSMB1) probe	<i>Del</i> of 6q (TBP) probe	6q <i>del</i>	18.6 Mb 6q <i>del</i> (6q25.1-qter) determined by array CGH
ab-210	<i>Del</i> of 2q (CAPN10) probe	<i>Del</i> of 2q (APG4B) probe	2q <i>del</i>	1.6 Mb 2q <i>del</i> (2q37.3-qter) determined by array CGH
4 cases	Bad pattern of amplification of probes Total number of cases: 119	Bad pattern of amplification of probes	No conclusion	

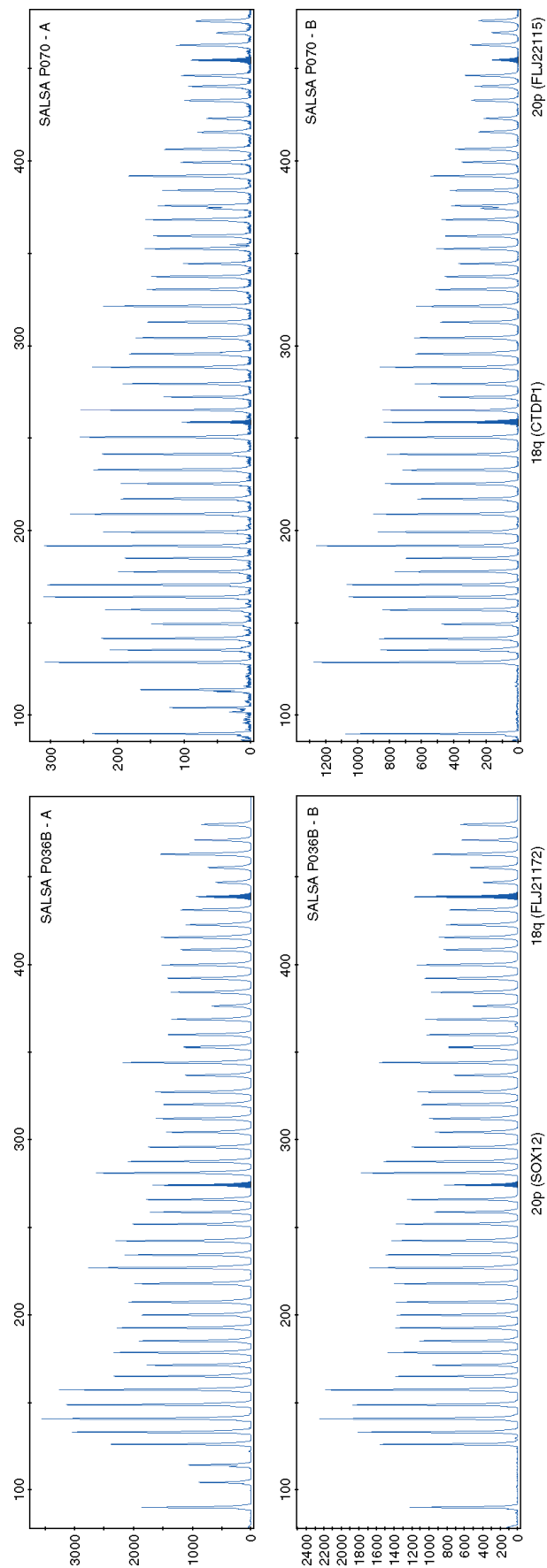


Figure 1—Electropherograms showing MLPA products for SALSA P036B (left) and SALSA P070 (right) probe mixes in (A) ab-69 [46,XY,der(18)t(18;20)(q21;p13)mat] and (B) a normal 46,XX control. Shadowed peaks in P036B correspond to SOX12 (20p) and FLJ21172 (18q) probes; shadowed peaks in P070 correspond to CTDP1 (18q) and FLJ22115 (20p) probes. Adjacent-I segregation (alternate segregation after a cross-over event within the interstitial segment could not be distinguished) ascertained from maternal meiosis [46,XX,t(18;20)(q21;p13)] leads to a combination of partial monosomy 18q21 > qter (*del* of 18q probes) and partial trisomy 20p13 > pter (*dup* of 20p probes) in the zygote. Probe recognition sequence deletion or duplication appears as a 35–50% variation of the relative peak area of the amplification product of that probe compared to that of a control



and aneuploidy as reported previously for fewer cases (Diego-Alvarez *et al.*, 2006). We found only one aneuploid miscarriage (ab-48) in which MLPA resulted in a normal value for one probe (PSPC1). However, duplication of the other three chromosome 13 probes confirmed the cytogenetic findings of trisomy 13. For this case, as well as for cases ab-10, ab-60, ab-166, ab-167, ab-177 and ab-213, no parental DNA was available to confirm or discard the presence of a potential polymorphism at the DNA sequence probe's target, which could lead to a misinterpretation of the results. We could also demonstrate the capability of MLPA to detect terminal deletions and duplications including those that are too small to be detected by karyotyping chromosome preparations (see cases ab-1, ab-21 and ab-179). These subtelomeric abnormalities, which have been extensively related to mental retardation, have not yet been associated with spontaneous abortions (SAs) (further studies are needed in order to assess its relevance in the cause of miscarriage).

However, MLPA encompasses some limitations for the detection of chromosomal anomalies; e.g. ploidy changes cannot be detected. This fact implies that the correct diagnosis would be missed in ~7% of miscarriages. Another limitation of MLPA is its inability to detect balanced chromosomal rearrangements, interstitial deletions or duplications, inversions or uniparental disomy. Likewise, detection of mosaicism would be limited by the prevalence of the aneuploid cell line.

The presence of copy number variation throughout the genome has been widely demonstrated (Sebat *et al.*, 2004; Iafrate *et al.*, 2004; Sharp *et al.*, 2005; de Vries *et al.*, 2005; Redon *et al.*, 2006). False positive results presumed by duplication or deletion affecting only one of the two probes of a chromosomal arm (i.e. only one probe mix; see 7 cases in Tables 1 and 2) are more likely to be considered copy number polymorphisms. Unfortunately, in almost all of these cases no parental DNA was available to confirm the presence of the same apparent polymorphism. Some of these polymorphisms have been quoted in MRC-Holland page (CAB45 and TNFRSF18 probes for 1p, CYFIP1 probe for 15p and MRPL41 probe for 9q). The existence of subtelomeric copy number polymorphisms renders testing samples with both probe mixes indispensable. Nevertheless, in addition to comparing the results with those of the parents, techniques such as FISH, QF-PCR or CGH should be employed in order to confirm MLPA results.

MLPA reactions are more sensitive to contaminants and PCR inhibitors such as small remnants of phenol. This could explain why no diagnosis could be established in four of our samples. However, results were obtained in 98% of the cases using MLPA, compared to 46% of the cases in which a karyotype could not be obtained. Although improvements in the processing of specimens may increase the culture success rate (Menasha *et al.*, 2005), the use of DNA instead of cell cultures represents a great advantage, especially in macerated or ethanol-fixed specimens. In fact, some authors have suggested that culture failures of SAs are most likely to be chromosomally abnormal (Fritz *et al.*,

2001) and that cell culture may yield normal karyotypes or selected abnormal ones that allow *in vitro* cell proliferation (Benkhalifa *et al.*, 2005). An array CGH study (Benkhalifa *et al.*, 2005) performed over 26 first trimester SAs that had failed to grow *in vitro* showed that 6 out of 15 aneuploid miscarriages presented two chromosomal abnormalities each, appearing autosomal monosomy over-represented (5 cases out of 15) compared to frequencies reported in the literature (Hassold *et al.*, 1980; Guerneri *et al.*, 1987; Nagaishi *et al.*, 2004). Abnormalities that were not commonly found in miscarriages such as terminal deletions, duplications and complex aneuploidies could be detected in the cases of actual study in which culture had failed. However, no autosomal monosomy could be found. These different rates of abnormalities compared to those obtained by Benkhalifa *et al.* (2005) are probably due to the fact that gestational age of samples in our study varied between the 6th and 24th week of gestation. Nevertheless, according to molecular findings of the present and other studies (Fritz *et al.*, 2001; Schaeffer *et al.*, 2004; Benkhalifa *et al.*, 2005), rates of chromosomal abnormalities in SAs need to be re-evaluated.

Although prenatal detection of aneuploidy involving chromosomes 13, 18, 21, X and Y by MLPA with the SALSA P095 probe mix has been previously reported (Slater *et al.*, 2003; Gerdes *et al.*, 2005; Hochstenbach *et al.*, 2005), the present study together with that of Bruno *et al.* (2006) reveals the possibility of a rapid prenatal screening for aneuploidy of each chromosome including unbalanced terminal chromosomal rearrangements in products of conception. Our results also demonstrate that a normal karyotype could bare subtle chromosomal alterations that are not detectable by conventional cytogenetic techniques (the correlation of alterations of this kind with the cause of miscarriage or embryo development arrest requires further studies). The employment of MLPA to study aneuploidies and unbalanced terminal chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages together with cytogenetics and other molecular techniques such as QF-PCR could provide a more refined and complete diagnosis and, what is more important, a diagnosis of those cases in which cell culture cannot be established or fails to grow.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Cristina Gonzalez Gonzalez for providing us with some samples, Pamela Orcajo and Robert G. H. Wilke for the English language revision and the Anatomopathologic and Obstetrics and Gynaecology services of FJD for the appreciable collaboration and support. Dan Diego Álvarez is sponsored by 'Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz'. This research was supported by a grant from FIS (PI05/0263; PI05/0408; C03/05).

#### REFERENCES

- Benkhalifa M, Kasakyan S, Clement P, *et al.* 2005. Array comparative genomic hybridization profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow *in vitro*. *Prenat Diagn* **25**(10): 894–900.

- Bruno DL, Burgess T, Ren H, *et al.* 2006. High-throughput analysis of chromosome abnormality in spontaneous miscarriage using an MLPA subtelomere assay with an ancillary FISH test for polyploidy. *Am J Med Genet A* **140A**: 2786–2793.
- de Vries BB, Pfundt R, Leisink M, *et al.* 2005. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet* **77**(4): 606–616.
- Diego-Alvarez D, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, *et al.* 2005. Application of quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages. *Hum Reprod* **20**(5): 1235–1243.
- Diego-Alvarez D, Ramos-Corralles C, Garcia-Hoyos M, *et al.* 2006. Double trisomy in spontaneous miscarriages: cytogenetic and molecular approach. *Hum Reprod* **21**(4): 958–966.
- Fritz B, Hallermann C, Olert J, *et al.* 2001. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH)—Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *Eur J Hum Genet* **9**(7): 539–547.
- Gerdes T, Kirchhoff M, Lind AM, Larsen GV, Schwartz M, Lundsteen C. 2005. Computer-assisted prenatal aneuploidy screening for chromosome 13, 18, 21, X and Y based on multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Eur J Hum Genet* **13**(2): 171–175.
- Gueneri S, Bettio D, Simoni G, Brambati B, Lanzani A, Fraccaro M. 1987. Prevalence and distribution of chromosome abnormalities in a sample of first trimester internal abortions. *Hum Reprod* **2**(8): 735–739.
- Hassold T, Chen N, Funkhouser J, *et al.* 1980. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* **44**(Pt 2): 151–178.
- Hochstenbach R, Meijer J, van de Brug J, *et al.* 2005. Rapid detection of chromosomal aneuploidies in uncultured amniocytes by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Prenat Diagn* **25**(11): 1032–1039.
- Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, *et al.* 2004. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* **36**(9): 949–951.
- Jobanputra V, Sobrino A, Kinney A, Kline J, Warburton D. 2002. Multiplex interphase FISH as a screen for common aneuploidies in spontaneous abortions. *Hum Reprod* **17**(5): 1166–1170.
- Lomax B, Tang S, Separovic E, *et al.* 2000. Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions. *Am J Hum Genet* **66**(5): 1516–1521.
- Menasha J, Levy B, Hirschhorn K, Kardon NB. 2005. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from a 12-year study. *Genet Med* **7**(4): 251–263.
- Nagaishi M, Yamamoto T, Iinuma K, Shimomura K, Berend SA, Knops J. 2004. Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan. *J Obstet Gynaecol Res* **30**(3): 237–241.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, *et al.* 2006. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* **444**(7118): 444–454.
- Schaeffer AJ, Chung J, Heretis K, Wong A, Ledbetter DH, Lese Martin C. 2004. Comparative genomic hybridization–array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages. *Am J Hum Genet* **74**(6): 1168–1174.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* **30**(12): e57.
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, *et al.* 2004. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* **305**(5683): 525–528.
- Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, *et al.* 2005. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet* **77**(1): 78–88.
- Slater HR, Bruno DL, Ren H, Pertile M, Schouten JP, Choo KH. 2003. Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). *J Med Genet* **40**(12): 907–912.

## ANEXO III

-Asociación Española de Genética Humana (AEGH)

⇒ [www.aegh.org](http://www.aegh.org)

-Fundación Jiménez Díaz – Capiro (FJD)

⇒ [www.capiosanidad.es/fjd](http://www.capiosanidad.es/fjd)

-Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO)

⇒ [www.sego.es](http://www.sego.es)

-Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER): uno de los siete consorcios CIBER creados por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) establecidos para fomentar la investigación de excelencia y la masa crítica de investigadores en el campo de la Biomedicina y las Ciencias de la Salud.

⇒ [www.ciberer.es](http://www.ciberer.es)

-Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI)

⇒ [www.ivi.es](http://www.ivi.es)

-*Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM): Catálogo de genes y enfermedades genéticas editado por el Dr. Victor A. McKusick y sus colegas de la Universidad Johns Hopkins University.

⇒ [www.ncbi.nlm.nih.gov/omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim)

-PubMed: servicio de la Biblioteca Nacional de Medicina de los EEUU que incluye alrededor de 17 millones de citas del MEDLINE y artículos biomédicos de revistas de las ciencias de la vida, incluyendo enlaces a artículos científicos y a otras fuentes relacionadas.

⇒ [www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)

-*Ensembl Genome Browser*: proyecto conjunto del EMBL - European Bioinformatics Institute (EBI) y el Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI) para desarrollar un sistema de software que incluye información actualizada acerca del genoma de distintos organismos eucariotas. Permite visualizar la localización cromosómica exacta y extensión de genes, clones y resto de marcadores sobre los cromosomas.

⇒ [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)

-*The GDB Human Genome Database*: provee información acerca de la secuencia, informatividad y localización de marcadores cromosómicos, además de las condiciones de amplificado de éstos mediante PCR en el caso de los microsatélites.

⇒ [www.gdb.org](http://www.gdb.org)

-*Database of genomic variants*: catálogo continuamente actualizado de las variaciones estructurales descritas en el genoma humano encontradas en controles sanos, con el objeto de relacionar la variación genómica poblacional con los datos fenotípicos. Contiene información de todos los CNVs descritos (Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C: *Detection of large-scale variation in the human genome*. Nat Genet. 2004 Sep;36(9):949-51).

⇒ <http://projects.tcag.ca/variation>

-*European Cytogenetics Association (ECA)*

⇒ [www.biologia.uniba.it/eca](http://www.biologia.uniba.it/eca)

-ECARUCA: base de datos europea que recoge datos clínicos y citogenéticos de pacientes con alteraciones cromosómicas de todos los centros miembros de la ECA.

⇒ [www.ecaruca.net](http://www.ecaruca.net)

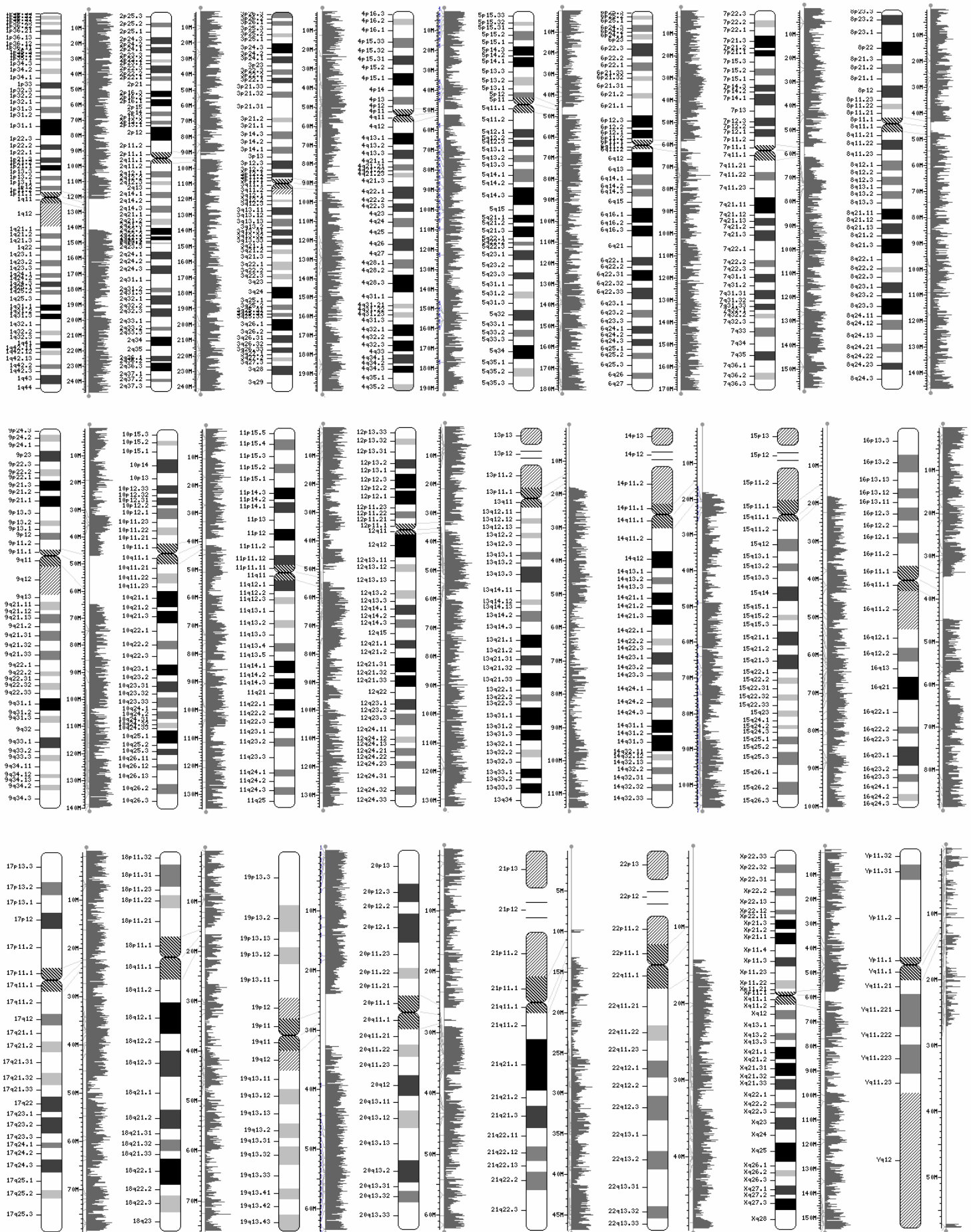
-*VIB Micro Array Facility (VIB MAF)*: provee información acerca de los arrays comercializados como los clones contenidos en éstos.

⇒ [www.microarrays.be](http://www.microarrays.be)

-MRC-Holland: página de la empresa que idea, diseña y comercializa los kits de MLPA donde se encuentra una descripción detallada de cada uno de ellos así como distintos protocolos, plantillas para el análisis de resultados y enlaces a publicaciones relacionadas con la técnica molecular.

⇒ [www.mrc-holland.com](http://www.mrc-holland.com)

## ANEXO IV



Ideogramas representando el patrón de bandeado G ( $\approx 850$  bandas) en cromosomas humanos normales (1-22, X e Y). La heterocromatina se representa mediante sombreado con líneas diagonales. A la izquierda de cada ideograma se especifican las regiones cromosómicas; a la derecha, el tamaño en Mb y la densidad génica relativa a lo largo del cromosoma. El tamaño relativo de cada cromosoma en la figura no se corresponde con el real.

ANEXO V





SERVICIO DE GENÉTICA

## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO DE RESTOS ABORTIVOS

D./DÑA.....

DNI:.....

DOMICILIO EN:.....

DECLARO:

Se me ha explicado por parte del médico del Servicio de Genética de la FJD y he entendido que:

- 1) A los restos abortivos procedentes de mi pérdida fetal se les va a realizar un estudio citogenético convencional.
- 2) Dado que en algunos casos, por la naturaleza y condiciones en que llega el material, no existe crecimiento en el cultivo y no puede realizarse el estudio, se ha iniciado un estudio de investigación para evaluar nuevas técnicas que permitan el estudio de este material.
- 3) Para ese estudio, parte del material seguirá el proceso de extracción de ADN y se estudiará mediante nuevas técnicas.
- 4) Es posible que de dicho estudio no se derive ningún resultado y puede prolongarse durante meses.
- 5) El servicio de Genética de la FJD guardará confidencialidad acerca del resultado del estudio.
- 6) La información del ADN de la muestra sólo será utilizada para este estudio.

ACEPTO que la muestra de restos abortivos recogida para realizar el estudio citogenético convencional, sea utilizada también para la investigación sobre el uso de nuevas técnicas en el estudio de pérdidas fetales.

Madrid, a.....

El paciente

El médico/investigador



SERVICIO DE GENÉTICA

## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO DE PAREJAS CON INFERTILIDAD.

D./DÑA.....

DNI:.....

DOMICILIO EN:.....

DECLARO:

Se me ha explicado por parte del médico del Servicio de Genética de la FJD y he entendido que:

- 1) Se me va a extraer una muestra de sangre para realizar el estudio citogenético.
- 2) Dado que en algunos casos existen anomalías submicroscópicas no detectables mediante técnicas convencionales, y requieren de herramientas citogenéticas y moleculares más avanzadas para su estudio (FISH, array-based CGH), se ha iniciado un estudio de investigación para evaluar la implicación de estas alteraciones cromosómicas submicroscópicas en la infertilidad humana. Para este estudio, parte del material seguirá el proceso de extracción de ADN y se estudiará mediante nuevas técnicas.
- 3) Es posible que de dicho estudio no se derive ningún resultado y puede prolongarse durante meses.
- 4) El servicio de Genética de la FJD guardará confidencialidad acerca del resultado del estudio.
- 5) La información que pudiera derivarse de la muestra sólo será utilizada para este estudio.

ACEPTO que la muestra que se me ha extraído para realizar el estudio citogenético convencional, sea utilizada también para la investigación sobre la implicación de alteraciones cromosómicas submicroscópicas en la infertilidad humana.

Madrid, a.....

El paciente

El médico/investigador

NOTA DEL AUTOR

## NOTA DEL AUTOR

La insaciable curiosidad del ser humano hacia todo aquello que lo rodea y desconoce, espera recibir respuestas lógicas al por qué de todos los procesos que acontecen a su alrededor, generando respuestas, en ocasiones basadas en experiencias más o menos rigurosas científicamente, a cuestiones del tipo “¿cuándo?”, “¿cómo?” o “¿por qué?”. La necesidad de resolver este tipo de cuestiones concierne también al caso que nos ocupa: el aborto espontáneo.

A nivel individual, uno esperará dar respuesta a la pregunta “¿por qué a mí?”, encontrando posibles explicaciones a la cuestión anterior que atribuyan la causa del suceso a la voluntad expresa de alguna divinidad, inculpándonos a nosotros mismos (en ocasiones quizás buscando al responsable en la otra mitad de la pareja) o, en el mejor de los casos, atribuyendo el suceso a algún fenómeno al que pueda dar respuesta el conocimiento científico. A nivel de especie, podríamos enunciar la cuestión del siguiente modo: “¿existe alguna razón?” o, “¿tiene acaso ésto algún sentido?”. En la mente de un biólogo, la pregunta bien podría ser formulada de la siguiente manera: “¿cuál podría ser el significado biológico del aborto espontáneo?”. De aquí en adelante, aprecie el lector, intentaré indagar de manera muy breve en la respuesta a tal cuestión refiriéndome en concreto a aquellos abortos cuya causa más probable son las anomalías cromosómicas y, como en 1973 observó Dobzhansky, desde una perspectiva evolutiva, sin la cual nada tiene sentido en biología.

Desde el punto de vista biológico, el ser humano se diferencia de otras especies de primates y en concreto de los primates antropomorfos (chimpancé, bonobo, orangután y gorila) en varios aspectos. Quizás, la diferencia más obvia y en la que todo el mundo pensará en un primer momento es en la capacidad lógica de deducción, abstracción y razonamiento, lo que le permitirá no sólo llevar a cabo una acción sino además, recordarla posteriormente, aprender de ella e incluso ser capaz de transmitirla a sus coespecíficos. De todos los primates, el *Homo sapiens sapiens* es el que posee un encéfalo de mayor tamaño y complejidad, lo que se encuentra estrechamente relacionado con otra característica que nos diferencia del resto de primates: la posición erguida y locomoción bípeda.

Algunas de las consecuencias más remarcables de la transición a esta posición erguida y locomoción bípeda son el desplazamiento y remodelación de estructuras anatómicas que sufrieron nuestros antepasados como por ejemplo, el estrechamiento y reorientación de la cavidad pélvica o canal del parto. Como consecuencia de este fenómeno, el diámetro de la circunferencia craneal del feto se encuentra limitado, lo que implica que los recién nacidos en la especie humana son los menos desarrollados de todos los mamíferos y por lo tanto, los más desvalidos. Este hecho conlleva la necesidad de un elevado gasto o contribución del cuidado parental. Es decir, asegurar la supervivencia

de las crías humanas resultará más costoso que en el caso de otras especies. Pero, ¿de qué manera podría relacionarse ésto con la elevada frecuencia de abortos espontáneos en la especie humana?

Algunos estudios concluyen que la incidencia de cromosomopatías en el conjunto de gestaciones de la especie humana es significativamente superior a la del resto de las especies de mamíferos estudiadas, sugiriendo que esta condición pudiera constituir una ventaja en nuestra especie desde el punto de vista evolutivo, de la siguiente manera: la predisposición genética a la no disyunción cromosómica y por tanto, a un mayor riesgo de aneuploidías en los gametos, constituiría un eficaz mecanismo natural de control de la natalidad en individuos de una especie en la cual la contribución energética parental en el cuidado de las crías puede comprometer las reservas de presupuesto energético para futuras crías e incluso, para la supervivencia del propio individuo. En términos de esfuerzo reproductor, supondrá menor compromiso energético sufrir un aborto espontáneo frente a gestar, dar a luz y sacar adelante a una desvalida cría. De alguna manera, los individuos con mayor éxito reproductor<sup>1</sup> “paradójicamente” serían aquellos que presentaran cierta predisposición genética a la no disyunción cromosómica en sus gametos y por tanto, aquellos que se habrían ido seleccionando positivamente a lo largo de la evolución.

Sirva lo expuesto anteriormente, extensamente discutible por otra parte, como mera invitación a la reflexión del lector acerca de algo tan fascinante y sobre lo que aún quedan tantas incógnitas por resolver, como es el tema de la evolución.

Dan Diego Álvarez  
Noviembre de 2007

Literatura recomendada:

*El gen egoísta*. Richard Dawkins, 1976.

*El mono desnudo*. Desmond Morris, 1967.

*El origen de las especies*. Charles Darwin, 1859.

*Evolución: la base de la Biología*. V.V.A.A., Manuel Soler editor, 2002.

*La especie elegida: la larga marcha de la evolución humana*. Juan Luis Arsuaga e Ignacio Martínez, 1998.

<sup>1</sup>-Se define éxito reproductor como la consecución del principal objetivo de la reproducción, que es incorporar el mayor número posible de descendientes viables a la siguiente generación sin comprometer la propia existencia.

